



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E A VACINAÇÃO CONTRA O CANCRO DO COLO DO ÚTERO**

Trabalho submetido por

**Catarina Wanzeller Teófilo**

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Setembro de 2013**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E A VACINAÇÃO CONTRA  
O CANCRO DO COLO DO ÚTERO**

Trabalho submetido por

**Catarina Wanzeller Teófilo**

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

**Doutora Ana Clara Ribeiro**

**Setembro de 2013**



## **AGRADECIMENTOS**

A todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização do presente trabalho, bem como para a minha formação académica e pessoal.

À minha orientadora Doutora Ana Clara Ribeiro, pela sua confiança, por todo o conhecimento transmitido e pelo acompanhamento e ajuda na elaboração desta tese.

Aos meus pais por me terem proporcionado este desafio. Sem vocês, nada disto seria possível.

Aos meus grandes amigos e ao Grupo de Acção Social do Tagus (GASTagus) pela presença constante, apoio incondicional, motivação e amizade.

Aos meus colegas de faculdade que me acompanharam em todos os momentos desta caminhada.

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz pela formação académica de excelência que me proporcionou durante todos estes anos, bem como a todos os professores pelos ensinamentos que me transmitiram.



## RESUMO

O Vírus do Papiloma Humano (HPV) está na origem de uma série de lesões benignas ou malignas e consoante o seu potencial oncogénico, isto é, a sua capacidade de causar lesões invasivas, pode ser dividido em HPV de baixo risco (BR) e de alto risco (AR). Estudos epidemiológicos demonstraram existir uma forte associação entre o HPV AR e o Carcinoma do Colo do Útero (CCU).

Mundialmente o CCU é a 3ª causa de morte entre as mulheres o que revela uma necessidade urgente de se criarem medidas estratégicas de prevenção e de combate à infecção pelo HPV.

A existência da vacina profilática contra a infecção pelo HPV potencia um avanço significativo no âmbito da prevenção primária do CCU e outras patologias associadas ao HPV. Actualmente estão aprovadas e licenciadas, a nível mundial, duas vacinas, nomeadamente a Cervarix® (vacina bivalente) que confere imunidade para o HPV do tipo 16 e 18 e a Gardasil® (vacina tetravalente) que protege contra o HPV 6, 11, 16 e 18.

Desde que em 2006 a vacinação foi autorizada, um crescente número de países, maioritariamente países desenvolvidos, tem vindo a adoptar e a introduzir estas vacinas no seu programa de vacinação. Esta implementação, de condições variáveis entre países, têm indicado um resultado positivo na diminuição da transmissão da infecção e no desenvolvimento de patologias relacionadas com os tipos de HPV contidos na vacina.

Diversos estudos epidemiológicos têm sido conduzidos de forma a avaliar a intervenção e o impacto da vacina. Muitos destes sugerem existir um benefício custo-efectividade, mas diversos autores indicam que o impacto da vacina e consequente avaliação custo-efectividade só se irá sentir dentro de 20 ou 30 anos.

Paralelamente continuam-se a desenvolver estudos – vacinas de 2ª geração - que visam prevenir a infecção e ultrapassar as limitações das vacinas existentes, bem como atingir um efeito terapêutico.

**Palavras-chave:** *Vírus do Papiloma Humano, Cancro do Colo do Útero, Cervarix®, Gardasil®.*





## ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is responsible for a number of benign and malignant lesions, and depending on their oncogenic potential, i.e. their ability to cause invasive lesions, they can be divided into low-risk (LR) and high-risk (HR). Epidemiological studies have shown a strong association between HPV-HR and Cervical Cancer.

Nowadays, Cervical Cancer still remains as the 3<sup>rd</sup> main cause of death among women globally, a fact that demonstrates an urgent need to create strategic measures in order to prevent and treat HPV infection effectively.

The already-known existence of a prophylactic vaccine against HPV infection provides a significant advance in primary prevention of Cervical Cancer and other HPV-related diseases. Currently there are two approved and licensed, available vaccinations, in the form of Cervarix (bivalent vaccination), that confers immunity to HPV types 16 and 18; and Gardasil (quadrivalent vaccination) that protects against HPV 6, 11, 16 and 18. Vaccination against HPV was authorized in 2006 and since then a growing number of countries, mainly developed ones, have been adopting and introducing these vaccines in their immunization program. The introduction of these inoculations, performed under different conditions across several countries, indicates a positive result in decreasing transmission of the HPV types that constitute the respective vaccinations.

Several epidemiological studies have been conducted to evaluate the action and impact of the vaccine. Many of them suggest that there is a cost-effective benefit. However many authors indicate that it will take 20 to 30 years to ascertain the clinical impact of the vaccine.

In the meanwhile studies are still being developed – 2<sup>nd</sup> generation vaccines – which aim to prevent infection and overcome the limitations of existing vaccines, as well as perfecting a therapeutic effect.

**Key-words:** *Human Papilloma Virus, Cervical Cancer. Cervarix®, Gardasil®.*



## ÍNDICE GERAL

I.	INTRODUÇÃO.....	15
II.	VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO .....	17
II.1.	Classificação e Taxonomia .....	17
II.1.1.	Género <i>Alpha-papillomavirus</i> .....	19
II.2.	Estrutura Viral.....	19
II.3.	Organização Genómica.....	20
II.4.	Ciclo de Vida Viral .....	22
II.5.	História Natural da Infecção por HPV .....	24
II.6.	Instabilidade Genómica e Carcinogénese .....	26
II.7.	Transmissão e Co-Factores da Infecção por HPV .....	28
III.	EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR HPV E CCU .....	31
IV.	RESPOSTA IMUNITÁRIA AO HPV .....	35
V.	ESTRATÉGIAS DE CONTROLO DA INFECÇÃO POR HPV .....	39
VI.	RASTREIO E DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV .....	41
VI.1.	<i>Guidelines</i> : Rastreio Citológico .....	43
VI.2.	<i>Guidelines</i> : Testes de Detecção.....	43
VII.	TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR HPV .....	45
VIII.	VACINAÇÃO .....	47
VIII.1.	Estudos de Efectividade Profilática.....	49
VIII.1.1.	Protecção Cruzada .....	52
VIII.2.	Estudos Custo-Efectividade .....	53
VIII.3.	Globalização da Vacina HPV .....	54
VIII.3.1.	Casos de Sucesso .....	54
VIII.3.2.	Vacinação em Portugal .....	55
IX.	NOVAS TERAPÊUTICAS: VACINAS DE 2ª GERAÇÃO .....	57
IX.1.	Vacinas Profiláticas.....	58

IX.1.1.	Vacinas profiláticas contra 9 tipos de HPV .....	58
IX.1.2.	Vacinas profiláticas dirigidas às proteínas da cápside L2 do HPV .....	58
IX.2.	Vacinas Terapêuticas.....	59
X.	CONCLUSÕES.....	61
XI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relação Filogenética/Evolucionária dos cinco géneros do HPV .....	18
Figura 2. Organização genómica do HPV 16 .....	20
Figura 3. Modelo de ligação e entrada do vírus .....	22
Figura 4. Progressão da Infecção por HPV e Carcinogénese .....	24
Figura 5. História natural da Infecção por HPV.....	25
Figura 6. Mecanismos moleculares pelo qual as oncoproteínas do HPV cooperam de forma a induzir a carcinogénese. ....	28
Figura 7. Resposta imunitária à infecção por HPV. ....	35
Figura 8. Modelo de latência e reactivação do HPV .....	36
Figura 9. Estratégias de Controlo e Intervenção da Infecção por HPV.....	39
Figura 10. Mecanismo de infecção do HPV do epitélio cervico-vaginal, e inibição da infecção por anticorpos VLPs .....	48
Figura 11. Vacina Profilática versus Vacina Terapêutica .....	60

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos factores de risco associados à infecção por HPV .....	29
Tabela 2. Métodos de Rastreio e Diagnóstico da Infecção por HPV .....	41
Tabela 3. Características das vacinas contra o HPV .....	49
Tabela 4. Resumo dos resultados provenientes dos ensaios clínicos realizados às vacinas Gardasil® e a Cervarix® .....	51
Tabela 5. Vacinas Profiláticas e Terapêuticas contra o HPV em desenvolvimento.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

A7	Alpha 7
A9	Alpha 9
AIN	Neoplasia anal intraepitelial
AR	Alto risco
AS0 <sub>4</sub>	Sistema adjuvante 04
BR	Baixo risco
CCU	Cancro do colo do útero
CD	Células dendríticas
CIN	Neoplasia intraepitelial
CL	Células de langerhans
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DST	Doença sexualmente transmissível
ELISA	Ensaio de ligação imuno-enzimático
GSK	GlaxoSmithKline Biologicals, S.A.
HC2	Captura híbrida 2
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Vírus do papiloma humano
HSIL	Lesão escamosa intraepitelial de alto grau
HSPG	Proteoglicanos de heparina sulfato
IARC	<i>International agency for the research on cancer</i>
LCR	Região reguladora não codificante
LSIL	Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau
MPL	Lípido A monofosforilado
ORF	Origem de replicação
pb	Pares de base
PCR	Reacção de polimerase em cadeia
PNV	Plano nacional de saúde
PV	Papíloma vírus
PVP	Preço de venda ao público
RB	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico

SNS	Sistema nacional de saúde
TLR	Receptor <i>toll like</i>
VaIN	Displasias vaginais
VIN	Displasias da vulva
VLP	<i>Virus like particles</i>



## I. INTRODUÇÃO

O Vírus do Papiloma Humano (HPV) pertence a uma família diversificada de vírus - Papiloma Vírus (PV) - encontrada em quase todas as espécies vertebradas, incluindo mamíferos, répteis e pássaros (Thomison, Thomas, e Shroyer, 2008).

A etiologia viral da infecção por PV, como agentes de verrugas humanas, foi estabelecida em 1907 por Ciuffo mas só em 1933 é que foi isolado e confirmado o primeiro PV (Carcopino, Henry, Olive, Boubli, e Tamalet, 2011). Com o início da microscopia electrónica foi possível observar-se pela primeira vez, em 1949, partículas virais em verrugas cutâneas e duas décadas mais tarde em verrugas genitais, o que reforçou a importância do estudo do HPV (Carcopino et al., 2011).

A relação causal entre a infecção por HPV e o Cancro do Colo do Útero (CCU) estabeleceu-se em 1983 quando Durst e seus colaboradores detectaram a presença da infecção por HPV 16 em aproximadamente 50% dos casos de CCU (Carcopino et al., 2011). No início dos anos 90, estudos epidemiológicos, relacionaram a presença da infecção por HPV 16 e 18 a 70% dos casos de CCU (Schiller e Lowy, 2012).

Actualmente existem mais de 150 genótipos sequenciados dos quais cerca de 40 afectam preferencialmente a mucosa genital: vulva, vagina, colo do útero, pénis e áreas perianais (Doorbar et al., 2012; Roden e Wu, 2006). Dos que afectam preferencialmente a mucosa genital, uns são considerados de alto risco (AR) por estarem associados a lesões escamosas intraepiteliais e cervicais de alto grau de malignidade, enquanto outros são considerados de baixo risco (BR) por estarem largamente associados a verrugas genitais e lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau de malignidade (Goldman e Schafer, 2012; Mu et al., 2004).

A infecção genital por HPV tornou-se uma das doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) mais comuns sendo que, por estar fortemente associado ao CCU, representa uma preocupação global (Bruni et al., 2010). Foi nos anos 90 que se iniciaram os estudos com o objectivo de criar uma vacina profiláctica. Em 2004 foi demonstrada a eficácia clínica da primeira vacina, contra o HPV 16 e 18. No ano seguinte comprovou-se a eficácia da vacina contra o HPV 6, 11, 16 e 18 (Carcopino et al., 2011).

A presente dissertação tem como objectivo a realização de uma revisão bibliográfica acerca do HPV e visa essencialmente compreender os mecanismos envolventes da infecção e consequente carcinogénese, bem como o benefício e impacto de estratégias de prevenção implementadas, nomeadamente da vacinação.



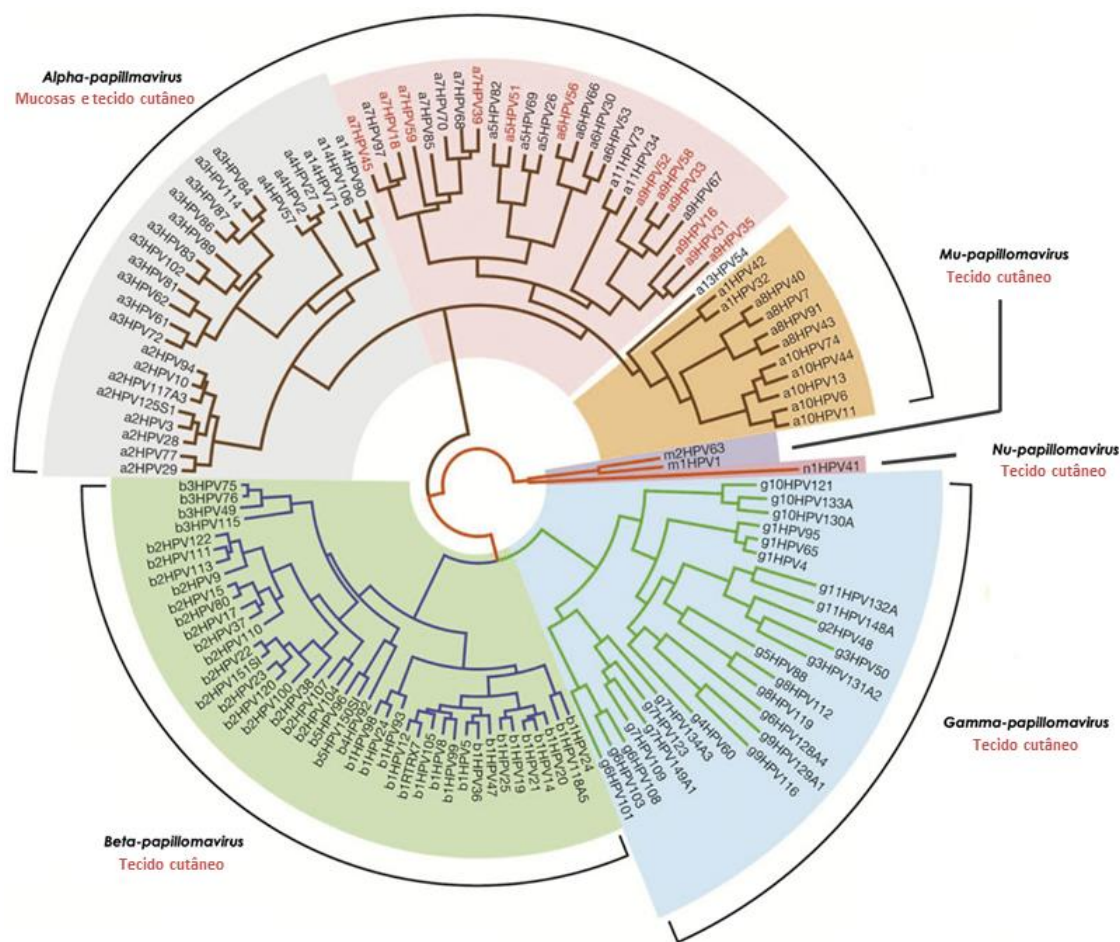
## II. VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO

### II.1. Classificação e Taxonomia

Inicialmente, entre 1950 e 1960, o PV foi incluído na família Papovavírus (*Papovaviridae*) juntamente com o Poliomavírus. Porém, na década de 1980, estudos demonstraram que as semelhanças encontradas entre os dois vírus eram demasiado superficiais e tendo em conta que a classificação taxonómica deve reflectir relações naturais, estes foram separados (Bernard, 2005; Bernard et al., 2010). Em 2004 o *International Council on Taxonomy of Viruses* reconheceu oficialmente o *Papillomaviridae* como uma família independente (Bernard, 2005). Dentro da família PV, o vírus que afecta os humanos é denominado de HPV.

A classificação do HPV é baseada na homologia encontrada na sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA) especificamente na sequência nucleotídica da principal proteína que codifica o vírus - L1 (Bernard et al., 2010). Os diferentes tipos de HPV encontram-se separados por cinco géneros (*Alpha-papillomavirus*, *Beta-papillomavirus*, *Gamma Papillomavirus*, *Mu-papillomavirus* e *Nu-papillomavirus*) sendo que dentro do mesmo género estão os que apresentam pelo menos 60% de homologia (**Figura 1**) (Bernard et al., 2010; de Oliveira Santos, Romanos, e Wigg, 2008; Ghittoni et al., 2010). Estes cinco géneros, identificados por uma letra do alfabeto grego, diferem tanto nas características do seu ciclo de vida como no seu tropismo e consequentemente patogenicidade (Bernard et al., 2010; Doorbar et al., 2012). Dentro de cada género, e baseado na análise sequencial de DNA, são considerados da mesma espécie (identificados por números árabes) os que partilham 60 a 70% de identidade nucleotídica e do mesmo tipo aqueles que dentro de determinada espécie apresentam entre 71 a 89% de homologia (de Oliveira Santos et al., 2008).

A diversidade do genoma é um factor que contribui para a variabilidade da patogenicidade (Bernard, Calleja-Macias, e Dunn, 2006).



### **II.1.1. Gênero *Alpha-papillomavirus***

O gênero *Alpha-papillomavirus* engloba 15 espécies onde se encontram diversos tipos de HPV. Das 15 espécies, as que suscitam maior interesse e relevância clínica por estarem associadas ao CCU é a espécie Alpha 7 (A7), onde se encontra o HPV 18, 39, 45, 59, 68, 70, 85 e 97, e a espécie Alpha 9 (A9), que engloba o HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58 e 67 (Doorbar et al., 2012).

De acordo com a sua capacidade em provocar lesões benignas ou malignas, o HPV pode ser dividido entre HPV de baixo risco (BR) e HPV de alto risco (AR) respectivamente (Goldman e Schafer, 2012).

Existe ainda alguma discordância na categorização dos vários tipos de HPV, mas de acordo com o *International Agency for the Research on Cancer* (IARC) os genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 são considerados como HPV-AR e os HPV 6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e 89 como HPV-BR (Banks, Blum, et al., 2012; Oliveira, Delgado, Verdasca, e Pista, 2013).

Existem ainda alguns tipos que não se encontram em nenhum destes dois grupos pelo que são considerados HPV de risco indeterminado: HPV 2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 69, 71, 74, 77, 83, 85, 86, 87, 90 e 91 (Oliveira et al., 2013). Os HPV 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 e 82 são considerados HPV de provável AR, pois apesar de estarem frequentemente associados a lesões pré-malignas, raramente são encontrados nos casos de CCU (Oliveira et al., 2013; Vincenzo, Ricci, Conte, e Scambia, 2013).

## **II.2. Estrutura Viral**

Os HPVs são partículas virais esféricas que não possuem invólucro. Contêm uma única molécula de DNA circular, considerada pequena, com uma sequência variável entre os 6000 e os 8000 pares de base (pb). Esta é delimitada por uma cápside composta por 72 capsômeros, de simetria icosaédrica e com um diâmetro aproximado de 55nm. A cápside é composta por duas proteínas estruturais: a proteína *major* L1, que representa cerca de 80% da proteína viral total; e a proteína *minor* L2 (Goldman e Schafer, 2012; Mu et al., 2004).

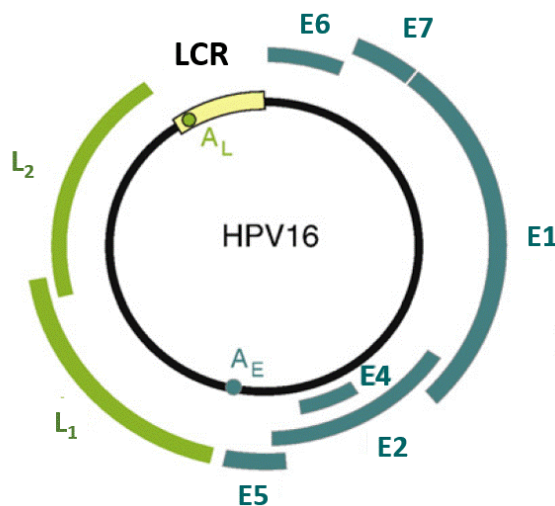
### II.3. Organização Genómica

O genoma do HPV compreende uma região reguladora não codificante (LCR) e oito genes, essenciais em várias fases do ciclo viral, divididos por três regiões funcionais (**Figura 2**) (Bernard et al., 2006; Ghittoni et al., 2010; Goldman e Schafer, 2012; Mu et al., 2004):

(i) **Região precoce ou *early genes* (E):** com cerca de 4000 pb, é constituída por seis genes funcionais precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) expressos imediatamente após a infecção e que codificam para proteínas envolvidas na replicação, transcrição e proliferação celular;

(ii) **Região tardia ou *late genes* (L):** inclui os genes L1 e L2 que são expressos em estadios mais avançados da infecção e que codificam para proteínas estruturais da cápside, *major* (L1) e *minor* (L2), fundamentais à formação e montagem da partícula viral infecciosa. Possui aproximadamente 3000 pb.

(iii) **Região reguladora não codificante ou *Long Control Region* (LCR):** encontra-se entre os genes L1 e E6. Detém cerca de 8500 pb e contém sequências reguladoras que controlam a replicação e a transcrição de genes precoces e tardios.



**Figura 2. Organização genómica do HPV 16.** Compreende uma região LCR, seis genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e dois genes tardios (L1 e L2) (Stanley, 2010a).

Cada proteína codificada pelo genoma do HPV tem a sua função específica (Banks, Blum, et al., 2012; de Oliveira Santos et al., 2008; Ghittoni et al., 2010; Thomison et al., 2008):

- (i) **E1:** é necessária à replicação de DNA viral. Reconhece e liga-se à origem de replicação do DNA viral, originando um complexo com o gene E2.
- (ii) **E2:** interage com a E1 e estimula a replicação do DNA viral. Está envolvida na regulação da transcrição dos genes E6 e E7 e possui um papel crítico na transferência do genoma viral para as células filhas, durante a divisão celular.
- (iii) **E4:** a sua função ainda permanece incerta mas é expressa em quantidades relativamente elevadas no epitélio escamoso diferenciado, onde a montagem e a libertação do vírus ocorre. Acredita-se estar relacionada com a destabilização celular da citoqueratina, que acaba por colapsar e libertar as partículas virais do epitélio escamoso;
- (iv) **E5:** aumenta a proliferação das proteínas E6 e E7, contribuindo para a fase produtiva do ciclo viral e consequentemente para a progressão do carcinoma;
- (v) **E6:** oncoproteína – interage com a proteína supressora de tumor p53 acelerando a sua degradação e permite a manutenção do comprimento dos telómeros. Ambos são mecanismos que contribuem para a imortalização celular e oncogénese;
- (vi) **E7:** oncoproteína – origina um ambiente favorável à replicação do DNA viral ao interagir com os membros proteicos da família do retinoblastoma (RB), nomeadamente com o pRb (105) e suas isoformas, (“*pocket-like proteins*”) p107 (controla a entrada do ciclo celular na camada basal) e p130 (envolvido na reentrada do ciclo celular nas camadas epiteliais superiores). Ambas regulam negativamente a proliferação celular;
- (vii) **L1:** proteína *major* da cápside (80%);
- (viii) **L2:** proteína *minor* da cápside.

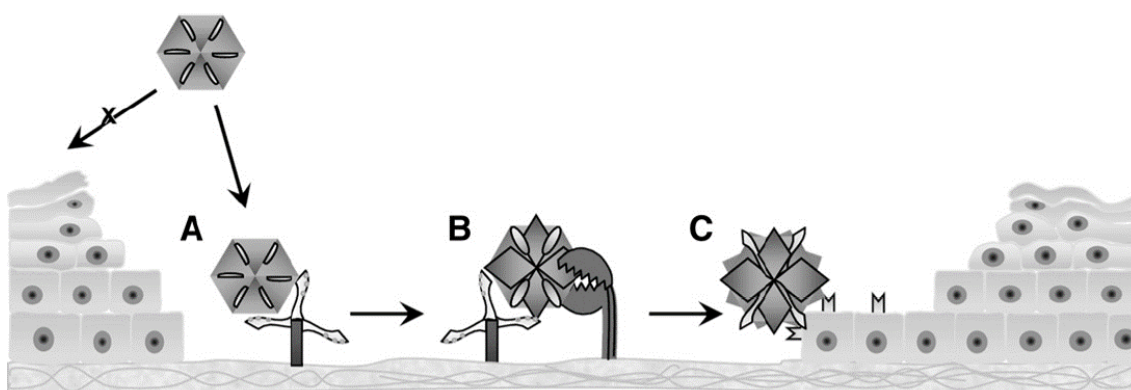
Os diversos tipos de HPV, independentemente de serem considerados de BR ou AR, tipicamente partilham esta estrutura e organização genómica (Bodily e Laimins, 2011).

## **II.4. Ciclo de Vida Viral**

Tipicamente os vírus infectam uma célula alvo e, a partir desta, produzem partículas virais. Na infecção por HPV, a síntese de novas partículas virais ocorre depois da célula infectada sofrer mitose e de uma célula filha migrar através da camada basal e sofrer diferenciação (Moody e Laimins, 2010).

O ciclo de vida do HPV ocorre exclusivamente no epitélio escamoso estratificado e está dividido em várias etapas: (i) entrada do vírus, (ii) fase não produtiva ou fase de manutenção e (iii) fase produtiva (**Figura 4**) (Banks, Blum, et al., 2012).

**(i) Entrada do vírus:** o mecanismo de entrada do vírus ainda não está completamente esclarecido mas considera-se que a penetração no epitélio é estabelecida através de micro-traumas que têm como objectivo atingir as células da camada basal. O virião ao atingir as células da camada basal liga-se aos proteoglicanos de sulfato heparina (HSPG) que se encontram à superfície das células. Esta ligação provoca uma alteração conformacional na estrutura da cápside, resultando na exposição da porção N-terminal da L2 e consequente clivagem. Após a clivagem da L2 ocorrem outras mudanças conformacionais que permitem ao virião ligar-se ao receptor do queratinócito e entrar na célula onde é transportado em direcção ao núcleo para transcrição e replicação. A internalização do virião é um processo lento de endocitose do qual ainda se desconhece se é devido a locais de ligação presentes na L1 e/ou na L2 (**Figura 3**) (Pereira, Hitzeroth, e Rybicki, 2009; Schiller, Day, e Kines, 2010; Thomison et al., 2008; Wang e Roden, 2013).



**Figura 3. Modelo de ligação e entrada do vírus.** A) O virião após ruptura liga-se a HSPGs. B) A ligação a HSPGs induz mudanças conformacionais e expõe a região N-terminal da L2 a um processo de clivagem. C) O virião, após clivagem da L2, consegue ligar-se aos receptores dos queratinócitos e entrar na célula (Schiller et al., 2010).



Após a infecção, o DNA viral pode ser mantido na forma epissomal (circular e não integrado) ou pode linearizar e integrar o genoma da célula hospedeira (Moody e Laimins, 2010).

**(ii) Fase não produtiva ou de manutenção:** quando o HPV penetra o núcleo da célula hospedeira, o genoma do vírus é mantido na forma epissomal e num número reduzido de cópias (50-100 cópias por célula) pelo que a replicação viral nesta fase é considerada não produtiva, ou seja, é mínima. Nesta fase apenas são expressos, em níveis muito baixos, os produtos dos genes precoces em células indiferenciadas (Bodily e Laimins, 2011).

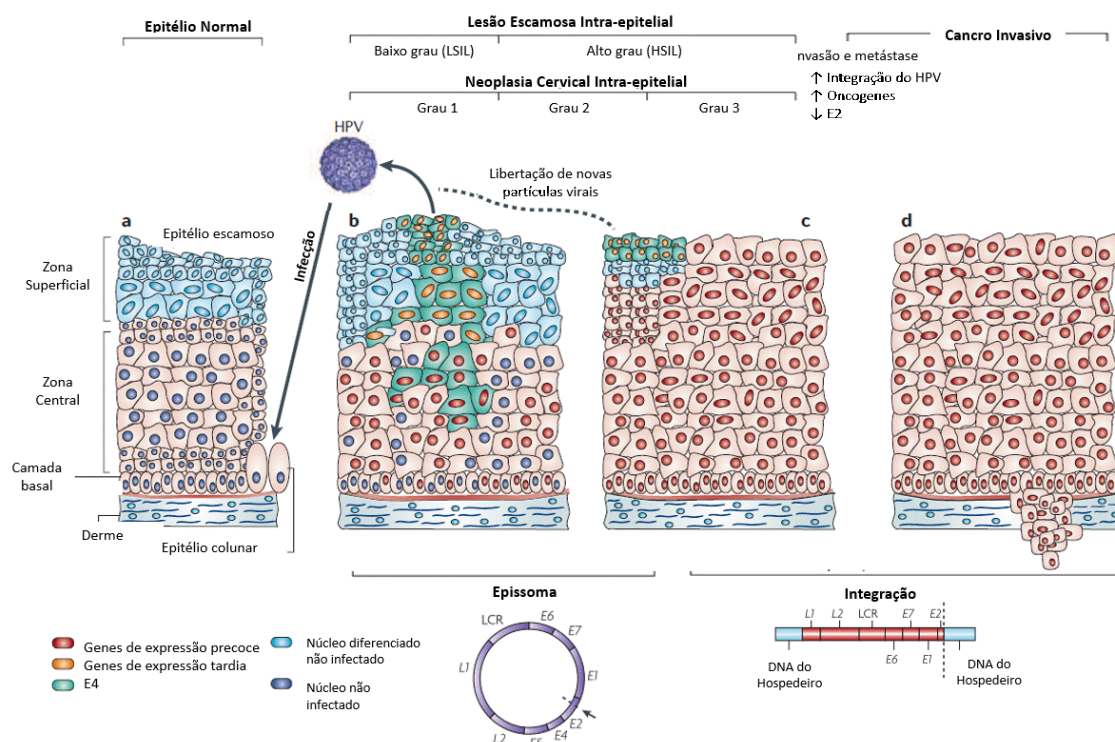
O genoma do HPV é incapaz de codificar DNA polimerases ou outras enzimas necessárias à replicação viral, à excepção da E1. Desta forma a replicação viral é completamente dependente da maquinaria celular do hospedeiro (Stanley, 2010a).

**(iii) Fase produtiva:** a natureza do local de infecção no epitélio, o genótipo do HPV, assim como a resposta imunitária do hospedeiro vão influenciar o ciclo de vida produtivo podendo este se completar ou não (Jong, Poelgeest, Hulst, Poelgeest, e Drijfhout, 2004). Esta fase inicia-se quando as células filhas, HPV positivas, atingem as células escamosas diferenciadas das camadas suprabasais (Banks, Blum, et al., 2012).

Na fase produtiva o genoma do HPV permanece geralmente na forma epissomal, ocorrendo uma fase proliferativa e de amplificação genómica. Numa fase tardia, as novas partículas virais sintetizadas são encapsuladas pelas proteínas da cápside L1 e L2 e os viriões formados são libertados através da camada superior do epitélio, sem causar lise celular, estando aptos para uma nova re-infecção (**Figura 4**) (Ferraz, Beatriz, Santos, e Discacciati, 2012; Moody e Laimins, 2010).

No caso de uma infecção persistente por HPV AR, o vírus tem tendência a integrar o genoma hospedeiro e neste caso, níveis elevados de proteínas virais são induzidos (Lin, Doolan, Hung, e Wu, 2010). A sobre-expressão dos genes E6 e E7 gera instabilidade genómica e desregulação do ciclo celular: atrasa a diferenciação terminal das células e re-direcciona a capacidade de replicação do DNA, estimulando o ciclo celular (as células continuam a dividir-se e a entrar repetidamente no ciclo celular) e permitindo a amplificação e proliferação do genoma viral em células que tipicamente, numa situação normal, teriam terminado ciclo celular. Desta forma não ocorre diferenciação das células nem produção ou libertação de novas partículas existindo uma incapacidade em

completar o ciclo produtivo do vírus (Banks, Blum, et al., 2012; Moody e Laimins, 2010).

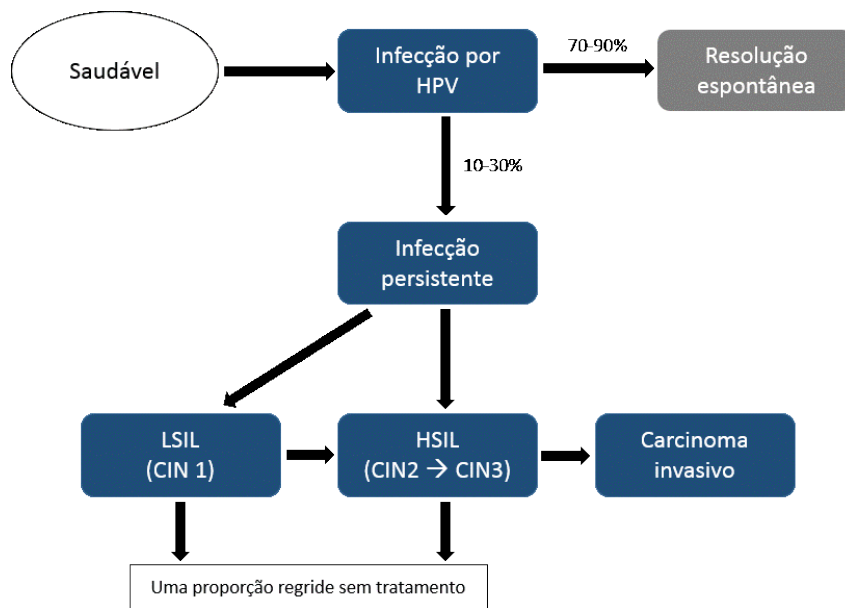


**Figura 4. Progressão da Infecção por HPV e Carcinogénese.** **a|** O HPV penetra através de micro-traumas da mucosa e infecta os queratinócitos da camada do epitélio basal. **b|** Após a infecção, os genes precoces do HPV E1, E2, E5, E6 e E7 são expressos e o DNA viral é replicado. Lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau (LSIL) são características desta fase. Nas camadas superiores do epitélio o genoma viral é replicado e os genes E4, L1 e L2 são expressos. Existe uma amplificação do genoma e a libertação de novas partículas infecciosas. **c|** Uma fracção significativa de infecção por HPV-AR progride para lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL), que demonstra um menor grau de diferenciação. **d|** A progressão e persistência de lesões não tratadas é associado à integração do genoma viral HPV no cromossoma hospedeiro, à diminuição do gene E2, ao aumento da regulação da expressão oncogénica (E6 e E7) e à instabilidade genómica, que resulta em invasão e metástase (adaptado de Banks, Pim, e Thomas, 2012; Roden e Wu, 2006; Woodman, Collins, e Young, 2007).

## II.5. História Natural da Infecção por HPV

Na maior parte dos casos, uma infecção por HPV é de resolução espontânea no entanto, pode tornar-se persistente. Uma infecção persistente por HPV pode conduzir a uma neoplasia intraepitelial do colo do útero (CIN) de grau leve (1), moderado (2) ou severo (3) (Chan, Picconi, Cheung, Giovannelli, e Park, 2012). A CIN 1 é considerada uma lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL) ao contrário da CIN 2 e 3 que são

consideradas lesões escamosas de alto grau (HSIL). A taxa de regressão de uma CIN vai diminuindo conforme o grau da lesão aumenta: uma CIN 1 apresenta uma taxa de regressão de 90%, uma CIN 2 entre 50-90% e uma CIN 3 entre 20 a 30% (Moscicki et al., 2012). Se não forem tratadas, as lesões CIN 2 e 3 têm alta probabilidade de progredirem para um carcinoma invasivo (**Figura 5**). O tempo entre uma infecção inicial por HPV e o desenvolvimento do CCU pode demorar até 20 anos (Saslow et al., 2012; World Health Organization, 2009).



**Figura 5. História natural da Infecção por HPV.** LSIL: são lesões associadas maioritariamente ao HPV de BR, em geral auto-limitadas, assintomáticas e que raramente progridem para carcinoma. HSIL: engloba o grau moderado (CIN 2) e grave (CIN 3) e são lesões pré-cancerígenas, associadas quase exclusivamente ao HPV AR e com considerável potencial evolutivo (adaptado de Chan et al., 2012).

Após a infecção ocorrer, há três expressões possíveis: (a) uma infecção clínica, (b) uma infecção subclínica, (c) ou uma infecção latente. As infecções clínicas são lesões benignas observáveis visualmente (condilomas); as subclínicas são frequentemente lesões benignas induzidas por HPV BR, podendo também manifestar lesões pré-malignas ou malignas desenvolvidas por HPV AR; as latentes não apresentam lesões, manifestações clínicas ou alterações celulares (Branco et al., 2004; Maglennon e Doorbar, 2012).

## II.6. Instabilidade Genómica e Carcinogénese

Para além do potencial oncogénico demonstrado pelos tipos de HPV-AR, existem outros eventos importantes que contribuem para a oncogénese, como mutações em genes celulares ou desequilíbrios cromossomais (aneuploidias e rearranjos cromossomais) induzidos por instabilidade genómica, o que torna a infecção por HPV-AR uma *“condição necessária, mas não suficiente para a progressão da carcinogénese”* (Stanley, 2010a; Vincenzo et al., 2013).

Nas lesões de baixo grau a maior parte do genoma do HPV persiste num estado epissomal ao contrário do que acontece nas lesões de alto grau, onde o genoma viral se encontra maioritariamente integrado no cromossoma hospedeiro. Esta relação pode de facto contribuir, em alguns casos, para a progressão maligna pois mais de metade dos carcinomas positivos para o HPV 16 e HPV 18 contém o genoma viral integrado (Moody e Laimins, 2010). A integração do genoma leva à diminuição ou supressão de vários genes (E2, E4, E5, L1 e L2) e à constante sobre-expressão dos oncogenes E6 e E7 (Lin, Doolan, et al., 2010).

Em lesões em que o DNA viral está na forma epissomal, a proteína E2, como parte do mecanismo que regula o número de cópias, reprime directamente a expressão de genes precoces. Com a linearização do DNA viral a função do gene E2 é habitualmente danificada, por quebra, e em consequência disso origina uma desregulação na expressão dos genes virais precoces, um passo crucial na progressão para a carcinogénese. Ocorre uma sobre-expressão dos genes E6 e E7, que gera uma capacidade hiper-proliferativa em detrimento da diferenciação e produção de novas partículas virais (Ferraz et al., 2012; Moody e Laimins, 2010).

Os genes E6 e E7 encontram-se altamente conservados em praticamente todos os tipos de HPV e no caso de carcinoma, associado ao HPV, estes codificam grande parte das proteínas alteradas, sendo por isso considerados fundamentais à manutenção do fenótipo transformado (Ghittoni et al., 2010).

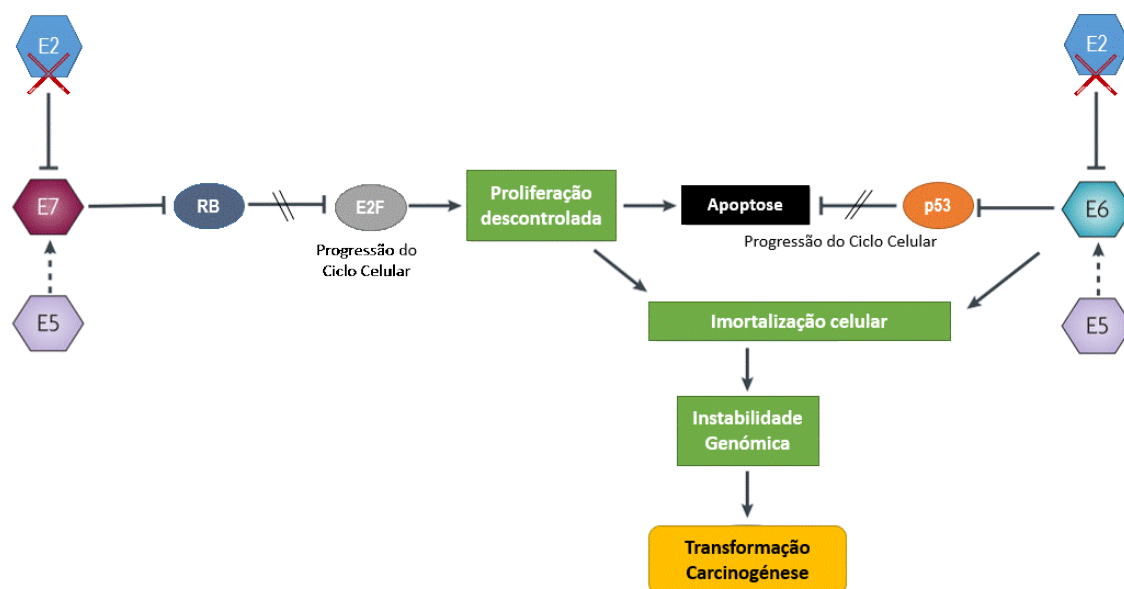
A capacidade de replicação das células infectadas é independente da diferenciação e é controlada por diversos factores celulares, dos quais se destacam os membros relacionados com a família RB: pRb (p105), p017 e p130 (Moody e Laimins, 2010). Todas as proteínas E7 de todos os tipos de HPV ligam-se a estes membros, inactivando

as suas funções. Porém as proteínas E7 de AR, por estarem integradas, fazem-no com maior afinidade estabelecendo uma ligação estável (Doorbar et al., 2012).

A família RB controla a transição da fase G1/S através da regulação de factores de transcrição da família E2F (Moody e Laimins, 2010; Sun, Bagella, Tutton, Romano, e Giordano, 2007). Os factores de transcrição E2F ligam-se à região promotora de vários genes que são essenciais à entrada do DNA na fase S do ciclo celular. Contudo, se o DNA precisar de ser reparado por estar danificado ou com erros, esta progressão da fase G1 do ciclo celular para a fase S fica comprometida e não acontece. Isto, e mais precisamente no *restriction point*, previne a acumulação de mutações genéticas no genoma celular (Sun et al., 2007). Em células normais dá-se a formação do complexo Rb-E2F, durante a fase G1, que reprime a transcrição de promotores E2F dependentes e a entrada na fase S. No *restriction point* a célula tem a oportunidade de reparar os danos no DNA antes de dar continuidade ao ciclo celular. No final da fase G1, os membros da família Rb são hiperfosforilados, dissociando-se da E2F que por sua vez está livre para interagir com as regiões promotoras e estimular a transcrição de genes específicos à fase S (Ganguly e Parihar, 2009; Moody e Laimins, 2010; Sun et al., 2007).

O E7 liga-se a pRb hipofosforilada e esta ligação estável, E7-Rb, impede a formação do complexo Rb-E2F. Isto permite a activação de factores de transcrição E2F que conduzem à sobre-expressão de genes de fase S e ao descontrolo dos mecanismos de regulação do ciclo celular. As células percorrem continuamente o ciclo celular, o que resulta numa proliferação celular descontrolada (Ganguly e Parihar, 2009). Esta afinidade e consequente supressão da função do Rb pela E7 leva a um aumento dos níveis de p53 que por sua vez aumenta a susceptibilidade de células, expressas pelo gene E7, sofrerem apoptose. De forma a prevenir os mecanismos de apoptose e a promover a proliferação celular tanto de células diferenciadas como indiferenciadas, as pE6 interferem com as funções do p53 acabando por a degradar (Ganguly e Parihar, 2009; Moody e Laimins, 2010). A diminuição dos níveis de p53 compromete a integridade do DNA replicado ao permitir a acumulação de mutações genéticas que tipicamente seriam resolvidas, promovendo a instabilidade genómica (Ferraz et al., 2012). Para além disso, as pE6 AR activam a transcrição da telomerase transcriptase reversa e mantêm a integridade dos telómeros durante repetidos ciclos de divisão celular quando estes numa situação normal deveriam ser encurtados. É de salientar que nem

esta actividade, nem a degradação do p53 são mediadas pela pE6 BR (Ganguly e Parihar, 2009). Esta acção, aliada à perda da função Rb pelo E7, constitui um passo essencial na imortalização celular (Doorbar et al., 2012; Ganguly e Parihar, 2009). Em combinação, todos estes mecanismos causam instabilidade genómica, imortalização celular e transformação o que potencia o desenvolvimento e a progressão de carcinomas (**Figura 6**) (Moody e Laimins, 2010).



**Figura 6. Mecanismos moleculares pelo qual as oncoproteínas do HPV cooperam de forma a induzir a carcinogénese.** A integração do genoma e consequente perda do E2 promove a sobre-expressão descontrolada do E6 e E7. A hiper-proliferação induzida pela proteína E7, por inibir a via pRb, promove a apoptose, que é bloqueada pela acção da proteína E6, através da inibição do p53. Esta acção, conjunta da E6 e E7, conduz à imortalização das células. Este processo, estimulado pela acção da proteína E5, promove a amplificação do número de células virais com tendência para a progressão de processos de transformação e malignidade (adaptado de Moody e Laimins, 2010).

## **II.7. Transmissão e Co-Factores da Infecção por HPV**

Para a construção e definição de estratégias para controlo da doença e de medidas preventivas para a população é essencial conhecer toda a dinâmica que envolve a transmissão do HPV (Veldhuijzen, Snijders, Reiss, Meijer, e van de Wijgert, 2010).

A transmissão da infecção por HPV requer um contacto directo pele-pele sendo a forma mais comum através do acto sexual. Todavia, as vias de transmissão podem ser sexual, não-sexual ou materno-fetal (transmissão vertical) (Veldhuijzen et al., 2010).

A transmissão não-sexual é pouco frequente e, por não se saber quanto tempo o vírus resiste fora do organismo, é considerada viável por um curto período de tempo. Pode

ocorrer através do contacto directo da pele ou mucosas, ou indirectamente através de objectos capazes de reter e transportar partículas infecciosas (Rombaldi, Serafini, Mandelli, Zimmermann, e Losquiavo, 2008).

A transmissão vertical, considerada uma infecção transitória, pode ocorrer, através do tracto genital, durante a passagem do bebé pelo canal vaginal no entanto é pouco frequente (Hahn et al., 2013).

A transmissão é dependente de vários factores, tanto do organismo patogénico, como do hospedeiro, incluindo o estado imunológico, sendo definida pela intensidade ou taxa de exposição, susceptibilidade e duração do contacto. Dos diversos co-factores associados (**Tabela 1**), os relacionados com o comportamento e actividade sexual são os que possuem um maior impacto (Chelimo, Wouldes, Cameron, e Elwood, 2013).

**Tabela 1.** Resumo dos factores de risco associados à infecção por HPV: Verrugas Genitais e Cancro do Colo do Útero no sexo feminino (Chelimo et al., 2013).

<b>Infecção por HPV</b>	<b>Verrugas Genitais</b>	<b>Cancro do Colo do Útero</b>
Novos parceiros sexuais; Múltiplos parceiros sexuais; Contraceção oral por um longo período; História prévia de infecção por Clamídia.	Positivo para o HPV Contraceção oral por um longo período; História prévia de infecção por Clamídia genital, Gonorreia, Herpes genital ou Trichomonas.	Parceiros sexuais HPV positivos; Múltiplos parceiros sexuais; • Tabaco e álcool <sup>1</sup> ; • Contraceção oral por um longo período (5 anos ou mais) <sup>1</sup> ; • Número de filhos (maior ou igual a cinco) <sup>1</sup> ; • Co-infecção com HIV ou com outras DSTs (herpes simplex tipo 2 e <i>Chlamydia trachomatis</i> ) <sup>1</sup> .

<sup>1</sup> Co-factores que aumentam o risco de CCU em mulheres HPV positivas. DSTs: Doenças Sexualmente Transmissíveis; HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana;

Em Portugal, um estudo realizado entre 2008 e 2009 demonstrou uma relação entre o número de filhos e o CCU, o uso prolongado de contraceptivos orais e os casos de CIN 3 e os hábitos tabágicos e história prévia de DSTs com os casos de CIN 2 (Pista, Oliveira, Lopes, e Cunha, 2013).





### III. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR HPV E CCU

A infecção genital por HPV é um das DSTs mais frequentes sendo que actualmente o CCU fortemente associado ao HPV tem vindo a representar um problema crescente de Saúde Pública (Bruni et al., 2010). Mundialmente, o CCU é considerado o terceiro cancro mais comum entre as mulheres e o segundo cancro mais comum na África Subsariana (Kohli et al., 2012; Louie, Sanjose, e Mayaud, 2009). Uma meta-análise conduzida em 2010 demonstrou uma maior prevalência da infecção por HPV na África Subsariana, (24.0%) seguida da América Latina e Caraíbas (16.1%), Europa Leste (14.2%) e Sudoeste Asiático (14.0%). No entanto existiram diferenças significativas entre regiões e países (Bruni et al., 2010).

Em 2008 foram detectados cerca de 529,000 novos casos de CCU e cerca de 274,900 mortes, sendo que a maior parte dos casos de CCU (aproximadamente 85%) ocorrem em países em vias de desenvolvimento (Ferlay et al., 2010; Forman et al., 2012). A maior morbilidade e mortalidade por CCU em países em vias de desenvolvimento resulta da inexistência ou ineficácia de programas de *screening* para a detecção e tratamento precoce das lesões precursoras (Kreimer, Rodriguez, et al., 2011; World Health Organization, 2009). Portugal demonstra uma alta taxa de incidência do CCU (13.5/100.000) e uma das taxas de mortalidade mais altas (4.5/100.000) na União Europeia, maioritariamente explicado pela baixa adesão ao programa de *screening* do CCU (Pista, Oliveira, Verdasca, e Ribeiro, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2009), a prevenção do CCU poderia chegar até aos 80% se fossem implementados programas de rastreio organizados e eficientes (World Health Organization, 2009).

É estimado que, durante a vida, 50 a 80% dos jovens sexualmente activos sejam infectados por, pelo menos, um tipo de HPV (Stanley, 2010b).

Globalmente existe uma correlação entre a prevalência do HPV e a idade, que demonstra uma alta percentagem em mulheres mais jovens (com menos de 25 anos de idade) com, um declínio evidente ao longo do tempo. Em algumas regiões, um segundo pico, embora ligeiro, é observado a partir dos 40 anos de idade (Bruni et al., 2010; Moscicki et al., 2012). Na Europa a taxa de prevalência do HPV é superior antes dos 25 anos de idade e tende a ser mais baixa após os 45 anos de idade (Bruni et al., 2010;

Forman et al., 2012). O facto de em mulheres mais jovens existir um pico de prevalência e incidência está relacionado com o seu comportamento sexual, considerado muitas vezes de risco (Veldhuijzen et al., 2010).

Apesar de a infecção por HPV ser mais comum entre o sexo feminino, ambos os géneros são susceptíveis sendo que as infecções anais, ainda que raras, estão a tornar-se cada vez mais comuns (Palefsky et al., 2011).

Dos HPV-AR, os genótipos 16 e 18 são responsáveis por 55-60% e 10-15% de casos de CCU no mundo, respectivamente, totalizando perto de 70%. O HPV 16 é o genótipo mais comum em todas as regiões, encontrando-se em segundo lugar o genótipo 18, seguido dos genótipos 31, 33, 35, 45, 52 e 58 (de Sanjose et al., 2010).

O HPV 6 e 11 são responsáveis por mais de 90% das verrugas genitais (Pista, Oliveira, Cunha, Paixão, e Real, 2011)

Entre 2008 e 2009, um estudo (*Cleopatre study*) de prevalência da infecção por HPV, realizado em Portugal numa amostra de 2326 mulheres revelou uma prevalência da infecção por HPV de 19.4%, existindo uma associação estatisticamente significativa entre a idade e a prevalência da infecção. A prevalência mais alta foi observada entre os 18 e os 24 anos de idade e decresceu com o aumento da idade. Ao extrapolar os resultados para a população feminina residente em Portugal entre os 18 e os 64 anos de idade a prevalência é de 12,7%. Em 76.5% das infecções por HPV foram detectados genótipos de AR, sendo que 36.6% envolvia múltiplos genótipos. Pelo menos um dos tipos de HPV 6, 11, 16 e 18 foi identificado em 32.6% das infecções. Destes, o tipo de HPV AR mais frequente foi o 16, com 19.7%. O HPV 18 foi detectado em 4.4% das amostras e outros tipos de HPV-AR como o 31, 51, 53 e 66 também foram identificados. Dos casos de infecção por HPV, 16.5% demonstraram uma amostra citológica normal, existindo uma associação estatisticamente significativa entre a infecção por HPV-AR e a presença de alterações citológicas (Pista et al., 2011).

No seguimento deste estudo, um segundo realizado igualmente em Portugal, demonstrou uma alta prevalência da infecção por HPV em amostras citológicas de CIN 2, CIN 3 e CCU. O estudo envolveu um total de 582 amostras (177 de CIN 2, 341 de CIN3 e 64 de CCU) do sexo feminino entre os 20 e os 88 anos de idade. A prevalência da infecção por HPV foi de 97.9% com maior prevalência para os genótipos de AR,

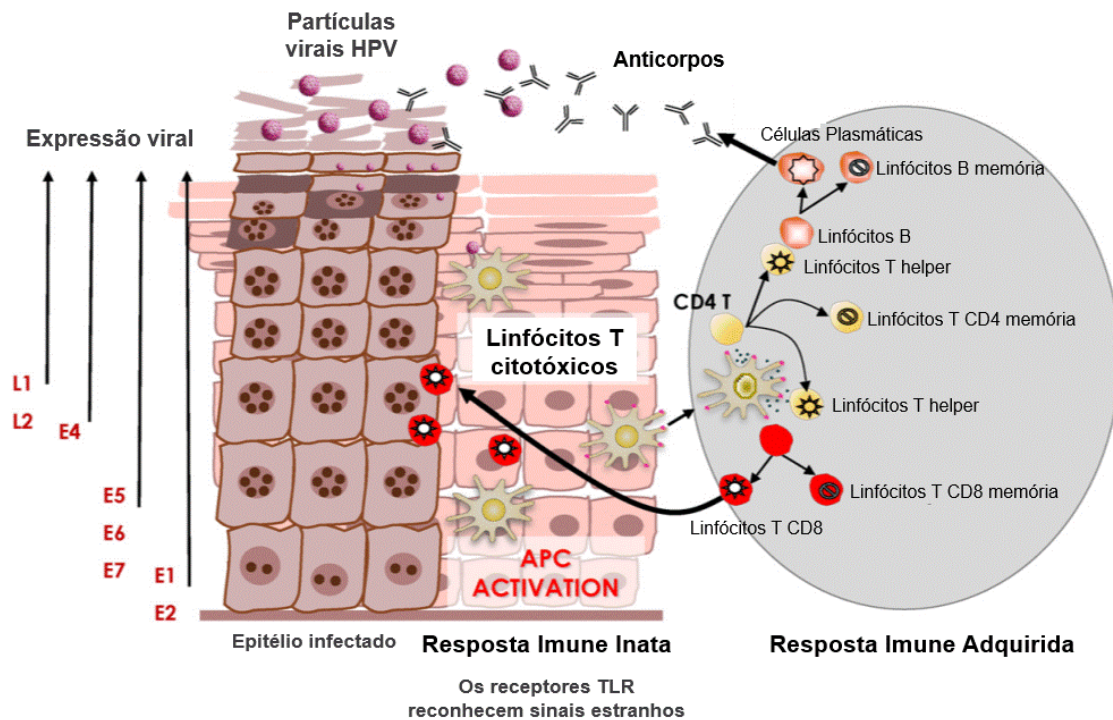
particularmente para o HPV tipo 16. Infecções múltiplas foram observadas em 11.2% dos casos. A prevalência da infecção por HPV foi de 95.5% para CIN 2, 99.4% para CIN 3 e 96.9% para o CCU. Os genótipos mais frequentes, por ordem decrescente, foram os HPV 16 (49.7%), 31, 58, 33, 51, 52, 18 e 35 em casos de CIN 2 e os HPV 16 (60.2%), 31, 33, 58, 52, 35, 18 e 51 em CIN 3. No CCU, os genótipos detectados foram HPV 16 (72.6%), 18, 31, 33, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59 e 73 sendo que o HPV 53 e 73 estavam sempre associados a outros HPV AR e o HPV 31, 51, 52, 56 e 59 foram detectados cada um em um caso. Não foi detectado nenhum tipo de HPV-BR o que confirma que a presença desse genótipo no CCU é raro (Pista et al., 2013).

Estes resultados sugerem que a vacinação em Portugal contra o HPV 16 e 18 tem o potencial de prevenir mais de dois terços dos casos de CCU (77.4%) e mais de metade dos casos de CIN 2 (54.4%) e CIN 3 (62.9%) (Pista et al., 2013).



#### IV. RESPOSTA IMUNITÁRIA AO HPV

A resposta imunitária a uma infecção resulta da interacção de mecanismos complexos inatos e adaptativos (**Figura 7**).



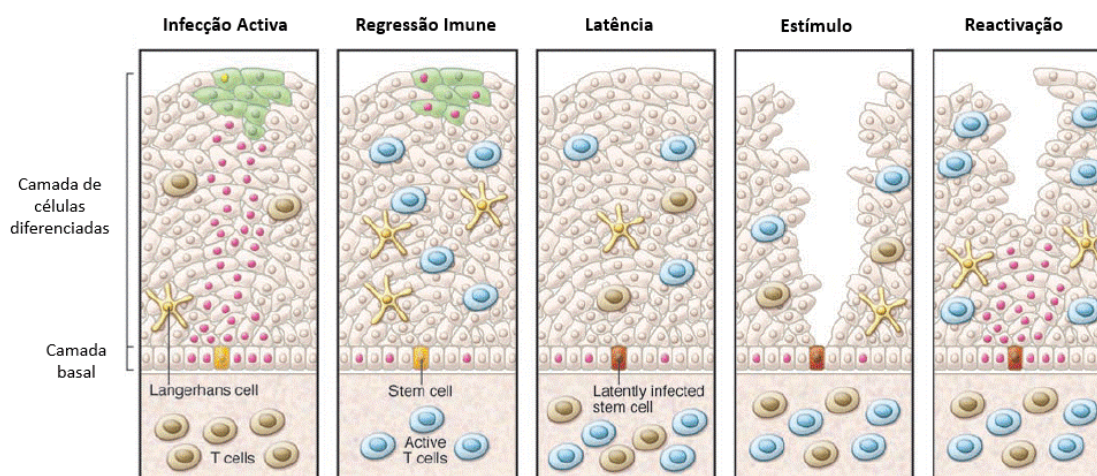
**Figura 7. Resposta imunitária à infecção por HPV.** As células dendríticas migram para os tecidos linfóides onde interagem com os linfócitos T e B e dão início à resposta imunitária adaptativa: os linfócitos T *helper* e T citotóxicos são activados sendo que as células T *helper* interagem com os linfócitos B de forma a activá-los e as células citotóxicas dirigem-se às células infectadas (Stern et al., 2012).

A imunidade inata actua como primeira linha de defesa, não específica (Stern et al., 2012). As células dendríticas (CD) encontradas maioritariamente no epitélio escamoso são as de *langerhans* (CL) e são, possivelmente, em conjunto com os interferões e as citocinas pró-inflamatórias, responsáveis por desencadear uma resposta imune inicial contra a infecção por HPV (Bodily e Laimins, 2011).

A imunidade adaptativa é formada pelos linfócitos B e T que medeiam, respectivamente a resposta humoral (quando o vírus circula) e a resposta mediada por células (quando o vírus entra nas células). A estimulação da imunidade adaptativa ocorre somente quando as partículas virais ou antígenos são transportados para os órgãos linfóides ou quando se obtém uma estimulação do sistema imune inato (Stern et al., 2012).

Uma infecção produtiva origina uma resposta imunológica adaptativa que, se for efectiva, produz uma infiltração e acumulação de linfócitos T (CD4 T *helper* e CD8 citotóxicas) que naturalmente leva à regressão do vírus (Gravitt, 2011). Os linfócitos T CD4 T *helper* activam os linfócitos B que por sua vez tornam-se efectores (células plasmáticas) capazes de produzir anticorpos específicos neutralizantes contra as proteínas da cápside viral. Esta resposta é considerada lenta e fraca. Os linfócitos CD8 reconhecem e provocam a apoptose das células infectadas (Stanley, Pinto, e Trimble, 2012; Stern et al., 2012).

Todavia, após um tratamento aparente, o vírus pode permanecer em estado de latência e neste caso, algumas células (possivelmente células estaminais ou células tronco) do epitélio basal celular conseguem reter, a longo prazo, o genoma viral, grande parte na sua forma episomal (**Figura 8**) (Maglennon e Doorbar, 2012). Neste caso, uma supressão do sistema imunológico, assim como nova exposição ou estímulo, podem conduzir a uma proliferação celular do vírus e consequente reactivação e estimulação dos linfócitos T memória (Gravitt, 2011).



**Figura 8. Modelo de latência e reactivação do HPV.** Regressão viral | O início de uma resposta imunitária eficaz, acompanhada predominantemente por uma infiltração de células T, conduz a regressão viral. Latência | Pode ocorrer, quando células da camada basal do epitélio conseguem conservar o genoma viral. Estímulo e Reactivação | Uma nova exposição pode estimular a divisão das células basais que retêm o genoma viral, e como resultado há reactivação e estimulação das células T memória nos tecidos adjacentes (Gravitt, 2011)

O HPV é considerado um fraco imunogénico por conseguir manter o hospedeiro imunologicamente ignorante o que, numa infecção primária por HPV (primeiro contacto), se exprime numa resposta imune habitualmente tardia caracterizada por um baixo índice de anticorpos neutralizantes específicos e por uma fraca resposta inflamatória local (Frazer, 2004; Mariani e Venuti, 2010).

O HPV reduz a resposta natural do hospedeiro através de vários mecanismos que escapam aos sistemas de defesa e que tornam o HPV uma das DSTs mais comuns no mundo (Mariani e Venuti, 2010). São infecções exclusivamente intraepiteliais, onde o acesso dos antígenos virais ao sistema vascular e linfático (onde as respostas imunes são iniciadas) é difícil e limitado; são mínimas as quantidades de replicação do vírus expostas às defesas imunes; há ausência ou praticamente nenhuma virémia; não origina citólise, necrose ou inflamação; a infiltração de citocinas pró-inflamatórias é reduzida e é capaz de inibir a síntese de interferões. Esta capacidade e habilidade do vírus, que o torna um agente infeccioso de sucesso, desempenham um papel central na persistência da infecção bem como na progressão maligna (Bodily e Laimins, 2011; Frazer, 2004; Mariani e Venuti, 2010).

Apesar dos mecanismos de defesa do próprio vírus, a infecção por HPV é tipicamente assintomática, transitória e auto-limitativa resolvendo-se, em aproximadamente 70 a 90% dos casos, dentro de um a dois anos após a primeira exposição, excepto na presença de condições que comprometam a imunidade do indivíduo (Kohli, Lawrence, Haig, Anonychuk, e Demarteau, 2012; Stanley et al., 2012). Uma infecção persistente por HPV que não seja correctamente eliminada, por falha ou insuficiência dos dois tipos de resposta – inata e adaptativa - do sistema imunitário, pode levar a uma propagação contígua das partículas virais nas células da mucosa e consequentemente ao desenvolvimento de lesões pré-cancerígenas resultando em CCU mesmo após várias décadas (Moody e Laimins, 2010; Saslow et al., 2012).





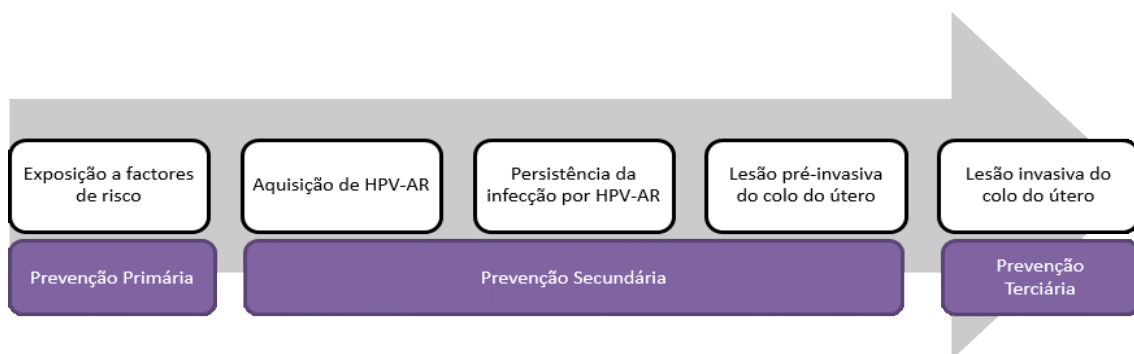
## V. ESTRATÉGIAS DE CONTROLO DA INFECÇÃO POR HPV

O grau de conhecimento da população em geral sobre o tema torna-se essencial para a determinação de estratégias apropriadas para uma intervenção eficiente (Medeiros e Ramada, 2010). As estratégias desenvolvidas centram-se essencialmente no *screening* e imunização pois, é numa fase inicial que existe uma maior possibilidade de actuação. Desta forma, existem três componentes básicos sendo que os dois primeiros, pelo seu potencial impacto, assumem um papel preponderante na redução da incidência das infecções por HPV e na morbilidade e mortalidade do CCU (**Figura 9**) (Liverani, 2013; Tota, Chevarie-Davis, Richardson, Devries, e Franco, 2011):

**(1) Prevenção primária:** engloba a prevenção da infecção por HPV através da vacinação e a implementação de estratégias apropriadas que evitem a exposição a factores de risco assim como de campanhas de informação e sensibilização sobre a infecção por HPV e medidas preventivas.

**(2) Prevenção secundária:** centra-se na detecção e diagnóstico precoce de lesões pré-malignas através de programas de rastreios (*screening*) adequados, organizados, eficientes e custo-efectivos e na formação para profissionais e de educação para a saúde.

**(3) Prevenção terciária:** abrange o tratamento tanto de lesões pré-invasivas como de lesões invasivas, e todo o apoio psicológico e familiar envolvido na gestão da doença.



**Figura 9. Estratégias de Controlo e Intervenção da Infecção por HPV.**

É essencial, enquanto Farmacêutico e Profissional de Saúde, assumir um papel de excelência e contribuir para a educação, sensibilização e prevenção da população, em especial aos grupos de risco.



## VI. RASTREIO E DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV

A prevenção primária do HPV inclui o rastreio e o diagnóstico da infecção por HPV. Há uma grande incidência da infecção por HPV e por isso o diagnóstico precoce assume um papel relevante no controlo da infecção e das lesões associadas pois os tratamentos disponíveis carecem de eficiência e as vacinas não actuam em infecções pré-existentes. (Bodily e Laimins, 2011). Para além disso, a detecção precoce permite uma terapêutica direccionada e efectiva, contribuindo para um melhor prognóstico. Os vários métodos de rastreio e diagnóstico estão apresentados e caracterizados na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Métodos de Rastreio e Diagnóstico da Infecção por HPV (Arbyn et al., 2007).

	Técnica	Sensibilidade/ Especificidade Analítica	Sensibilidade/ Especificidade Clínica para CIN 3/ CCU
<b>Baseado na morfologia celular</b>	PAP	Não aplicável	Baixa/ Alta
	Colposcopia	Não aplicável	Moderada/ Baixa
	Inspecção Visual	Não aplicável	Baixa/ Baixa
<b>Detecção de proteínas HPV</b>	Imunocitoquímica/ Histoquímica	Baixa/ Alta	Baixa/ Baixa
	Microscopia Electrónica	Baixa/ Alta	Baixa/ Baixa
	Western Blot	Baixa/ Alta	Baixa/ Moderada
	Southern Blot	Moderada/ Alta	Moderada/ Moderada
<b>Detecção do genoma HPV</b>	Hibridização <i>in situ</i>	Moderada/ Moderada	Moderada/ Moderada
	Dot Blot	Baixa/ Alta	Baixa/ Alta
	Captura Híbrida	Alta/ Alta	Alta/ Moderada
	PCR	Alta/ Alta	Muito alta/ Moderada-alta
	Real-Time PCR	Muito alta/ Alta	Muito alta/ SD
<b>Detecção de anticorpos anti-HPV: ELISA</b>	Peptidos	Baixa/ Baixa	Baixa/ Baixa
	VLPs	Moderada/ Alta	Baixa/ Baixa
	Fusão da E6/E7	Alta/ Moderada	Baixa-moderada/ Alta

CIN: Neoplasia Cervical Intraepitelial; ELISA: Ensaio de ligação Imuno-enzimático; SD: sem dados; PAP: Teste Papanicolau; PCR: Reacção de Polimerase em Cadeia; VLPs: *Virus-like particles*. Sensibilidade analítica: quantidade mínima de genoma viral presente na amostra necessária para gerar um resultado positivo. Especificidade analítica: capacidade do teste em identificar apenas a substância em questão. Sensibilidade clínica: proporção de pacientes com a doença que apresentaram teste positivo. Especificidade clínica: proporção de pacientes com ausência de doença que apresentaram teste negativo.

O diagnóstico citológico (PAP) caracteriza-se pela presença de alterações celulares e apesar de ser o método de rastreio de eleição apresenta sensibilidade reduzida, detecta apenas alterações celulares e clínicas da infecção, não detecta a presença efectiva do HPV e é dependente da qualidade da colheita bem como da interpretação do analista pelo que apresenta limitações e desvantagens quando comparado com às técnicas de biologia molecular. A sua vantagem está no seu preço reduzido. Para um resultado mais fidedigno do rastreio deve ser realizada, em paralelo, uma colposcopia (exame de avaliação visual do tracto genital inferior) (Branco et al., 2004).

A detecção de proteínas HPV, descrita na tabela 2, é dependente da preservação da amostra e do tecido e não determina o tipo de HPV (Arbyn et al., 2007).

Os métodos moleculares, considerados directos, são frequentes e englobam diversas técnicas sendo a mais recorrente o teste de Captura Híbrida (HC2) e a Reacção de Polimerase em Cadeia (PCR) (Poljak et al., 2012).

O PCR tipifica o tipo de HPV presente mas não permite a quantificação viral, ao contrário da HC2 que não tipifica mas quantifica. O PCR, através do uso de *primers*, isto é, oligonucleótidos introdutórios, amplifica exponencialmente e de forma específica um pequeno segmento de DNA complementar.

O teste de HC2 é baseado no uso de anticorpos que detectam híbridos DNA-RNA através da amplificação do sinal dos híbridos formados. Utiliza sondas sintéticas de RNA altamente específicas e complementares às sequências genómicas de 18 tipos de HPV e que são agrupadas em duas reacções distintas. Uma contém 13 tipos de HPV AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e outra contém cinco tipos não oncogénicos (6, 11, 42, 43 e 44). Habitualmente só as sondas de AR é que são utilizadas (Chan et al., 2012).

A capacidade que o HPV tem em escapar aos mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro, limita a utilização do teste serológico (ELISA). Desta forma, a detecção da infecção por HPV é baseada essencialmente numa abordagem molecular (Chan et al., 2012).

A escolha do método depende da aplicação que se pretende. Se o diagnóstico não for efectuado com precisão, o prognóstico pode-se agravar e daí advirem diversas complicações.

### **VI.1. *Guidelines*: Rastreo Citológico**

O rastreo do CCU está recomendado a partir dos 21 anos de idade e consoante a idade e história clínica, o método de rastreo deve ser adaptado. Para mulheres entre os 21 e os 29 anos, com dois ou mais testes citológicos negativos, o rastreo citológico está recomendado a cada três anos. Entre os 30 e os 65 anos de idade está recomendado o rastreo citológico a cada três anos e o teste de detecção do HPV a cada cinco anos. A partir dos 65 anos de idade, mulheres com evidência de rastreios prévios negativos (três citologias negativas consecutivas e dois testes de detecção do HPV negativos consecutivos nos últimos dez anos) e sem história clínica de CIN 2 nos últimos 20 anos não devem ser submetidas a rastreo do CCU. Caso contrário, o seguimento deve continuar por mais 20 anos (Saslow et al., 2012).

### **VI.2. *Guidelines*: Testes de Detecção**

O teste de detecção da infecção por HPV deve ser realizado em contexto apropriado sendo indicado nos seguintes casos: (i) mulheres com mais de 30 anos e idade em conjunto com o rastreo citológico, (ii) pacientes com resultados citológicos inconclusivos/indeterminados (exemplo: presença de células atípicas) que determina quais os pacientes que se devem dirigir à colposcopia, (iii) no seguimento de pacientes com colposcopia inicial negativa mas resultados citológicos irregulares, (iv) estágios pré-cancerígenos iniciais ou moderados de forma a prever a regressão, persistência ou progressão da lesão e pacientes que receberam tratamento de lesões pré-cancerígenas e cancerígenas de forma a avaliar a terapêutica (Poljak et al., 2012).



## **VII. TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR HPV**

A escolha da terapêutica depende essencialmente da idade do paciente, do seu estado imunitário, do tipo de HPV, localização, extensão e evolução das lesões, do custo e da preferência do paciente. Os métodos terapêuticos correntes são (Arbyn et al., 2007; Branco et al., 2004):

**(i) Agentes químicos e citotóxicos:** Ácido Tricloroacético, Podofilina, Podofilotoxina e 5-Fluorouracilo. Os tratamentos que utilizam Ácido Tricloroacético, Podofilina e Podofilotoxina visam a destruição de lesões genitais externas e podem ser aplicados pelo doente. A Podofilina e a Podofilotoxina são agentes citotóxicos com acção necrotizante. O 5-Fluorouracilo, utilizado em lesões extensivas, é um anti-neoplásico citostático que causa a destruição do tecido por interferir com a síntese de DNA e RNA.

**(ii) Tratamentos cirúrgicos:** crioterapia, cirurgia a laser, cirurgia com bisturi clássico e electrocoagulação. Estes são procedimentos efectuados apenas pelo médico, em geral em casos de recidivas ou de lesões muito extensas.

**(iv) Imunomoduladores:** interferão e Imiquimod indicados para verrugas genitais. O interferão tem acção anti-viral, anti-proliferativa e imunoestimulante. O Imiquimod é capaz de potenciar a resposta imunológica face à infecção ao induzir a produção de interferões e outras citocinas. É indicado apenas para lesões externas e pode ser aplicado pelo paciente.

Apesar de existirem diversas formas de tratamento, a maior parte das vezes o tratamento é misto e surge de uma combinação de terapêuticas; não há um tratamento único, é individualizado e personalizado à situação (Branco et al., 2004). Nenhum tem a capacidade de eliminar o vírus; o objectivo é de controlar a doença dado que a maioria tem como finalidade destruir o tecido infectado. Pode existir a possibilidade de recidivas daí a importância de uma vigilância e acompanhamento clínico após tratamento (Arbyn et al., 2007).

As vacinas não têm a capacidade de eliminar infecções já existentes o que sublinha a necessidade de se continuar a criar e a desenvolver estratégias terapêuticas contra infecções existentes bem como métodos de rastreio e diagnóstico precoce (Bodily e Laimins, 2011).





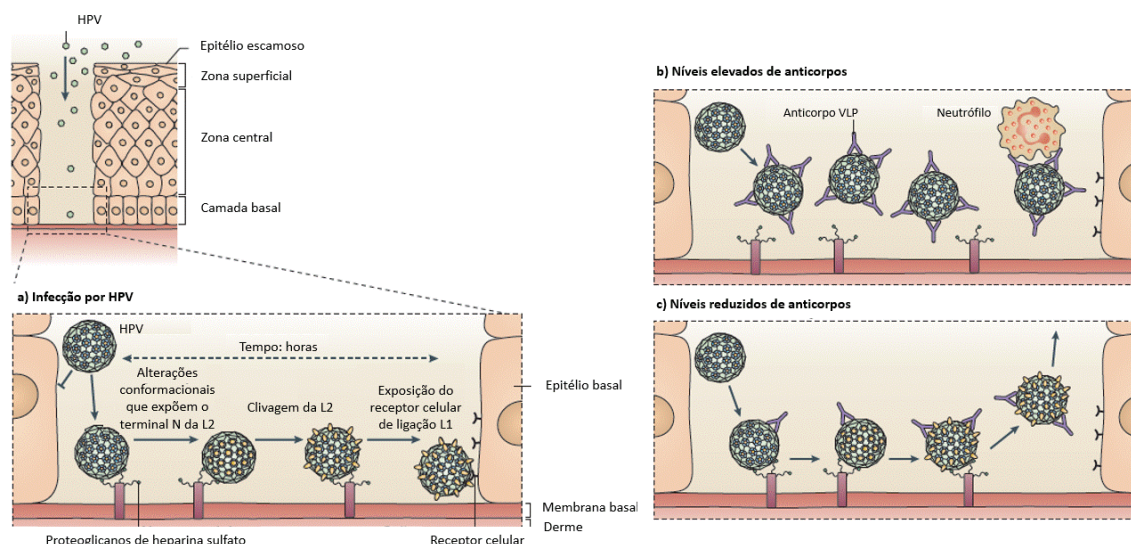
## VIII. VACINAÇÃO

Actualmente são duas as vacinas licenciadas e comercializadas, apenas para uso profilático, que conferem imunidade contra a infecção por determinados tipos de HPV (European Medicines Agency, 2010, 2013):

- i) **Cervarix®**: vacina bivalente produzida pela GlaxoSmithKline Biologicals, S.A. (GSK) que confere imunidade contra os tipos de HPV 16 e 18 responsáveis por cerca de 70 a 75% dos casos de CCU;
- ii) **Gardasil®**: vacina tetravalente, desenvolvida pela Merck Sharp e Dohme BV que para além de incorporar antígenos contra o HPV 16 e 18 também incorpora contra o HPV 6 e 11 responsáveis por cerca de 90% dos casos de verrugas genitais.

Obtidas por tecnologia de DNA recombinante, são vacinas constituídas por partículas semelhantes ao vírus (*Virus like particles* - VLPs) L1, para que o organismo, na presença de uma infecção, as reconheça fácil e rapidamente (European Medicines Agency, 2010, 2013). Estas partículas, não oncogénicas e não-replicas, são incapazes de causar infecção pois, apesar de serem VLPs, apenas mimetizam o HPV em morfologia e imunogenicidade pelo que não contêm material genético ou genes virais específicos exigidos à infecção por HPV (Brotherton e Gertig, 2011; Mariani e Venuti, 2010; Schiller, Castellsagué, e Garland, 2012). São VLPs altamente purificadas a partir da proteína L1 da cápside viral podendo o seu genótipo ser bivalente - 16 e 18 – (Cervarix®) ou tetravalente - 6, 11, 16 e 18 – (Gardasil®) (European Medicines Agency, 2010, 2013).

São estruturas altamente imunogénicas (**Figura 10**) que, ao contrário da resposta imune natural do hospedeiro à infecção por HPV, induzem altas concentrações de anticorpos neutralizantes da L1, provocando uma resposta imunológica forte, muito superior à infecção natural e mesmo na ausência de adjuvantes (devido à sua habilidade em activar tanto uma resposta imune inata como adaptativa) (Mariani e Venuti, 2010). Esta qualidade e quantidade de resposta imune acontecem fundamentalmente devido à sua rota de imunização e alta concentração de antígenos VLPs L1. As vacinas ao serem administradas intramuscularmente com uma elevada dose de antígenos, permitem um acesso quase imediato aos nódulos linfáticos e ao baço e desta forma uma exposição directa das proteínas L1 ao sistema imune o que marca o início de respostas imunes adaptativas (Mariani e Venuti, 2010; Stanley et al., 2012).



**Figura 10. Mecanismo de infecção do HPV do epitélio cervico-vaginal, e inibição da infecção por anticorpos VLPs. a)** A ligação inicial do HPV à membrana basal, exposta ao micro-traumatismo, é mediada pelos proteoglicanos sulfato de heparina. Antes de alcançarem as células alvo (queratinócitos), os viriões têm de sofrer uma série de alterações conformacionais, como a clivagem da proteína da cápside L2 (amarelo), de forma a expor o local de ligação da proteína da cápside L1 (azul). Ao dar-se a ligação do receptor celular do queratinócito do epitélio basal com o possível receptor a proteína da cápside L1, ocorre a internalização do vírus e consequente infecção viral. **b)** Níveis elevados de anticorpos induzidos pelos VLPs previnem a ligação inicial do vírus à membrana basal, o que por sua vez impossibilita as alterações conformacionais necessárias à ligação do virião à superfície celular e viabiliza uma resposta eficiente por parte do sistema imunitário. **c)** Baixos níveis de anticorpos induzidos pelos VLPs permitem a ligação do vírus à membrana basal e respectivas alterações conformacionais, porém impedem uma associação estável entre o virião e o receptor da superfície do epitélio basal (Schiller e Lowy, 2012).

Ambas contêm na sua formulação um adjuvante, um sal de alumínio, que tem como função precipitar os VLPs e, aumentar a sua imunogenicidade através da libertação lenta dos antígenos e consequente, activação da resposta inata e estimulação da resposta celular dos linfócitos B (resposta adaptativa humoral). Os linfócitos B ligam-se aos antígenos e são activados pelos linfócitos T *helper* 2 CD4, tornando-se efectores (células plasmáticas) capazes de secretar anticorpos neutralizantes que bloqueiam a infecção primária por HPV (Lin, Roosinovich, Ma, Hung, e Wu, 2010; Schiller e Lowy, 2012). Para além do sal de alumínio, a Cervarix® inclui um outro adjuvante, o lípido A monofosforilado (MPL) – que em conjunto com o fosfato de alumínio compõe um complexo sistema adjuvante 04 designado AS04. O MPL é um metabolito de um lipopolissacárido bacteriano Gram e, funciona como um agonista receptor *toll-like* 4 (TLR4). Através do receptor TLR4, activa uma resposta imune inata superior que

provoca um aumento da resposta dos anticorpos contra os VLPs (Schiller et al., 2012; Schiller e Lowy, 2012). A Cervarix® revelou níveis de anticorpos neutralizantes superiores à Gardasil® que podem ser explicados pela presença do sistema ASO<sub>4</sub> (Einstein et al., 2009). De salientar que a Cervarix® é a primeira vacina profilática a conter um agonista TLR aprovado pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (Schiller et al., 2012).

As características das duas vacinas encontram-se descritas na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Características das vacinas contra o HPV (Lin, Doolan, et al., 2010)

Vacina	Gardasil®	Cervarix®
<b>Indústria Farmacêutica</b>	Sanofi Pasteur MSD	GlaxoSmithKline Biologicals
<b>Tipos de VLPs</b>	6/ 11/ 16/ 18	16/ 18
<b>Dose de antígeno L1</b>	20/ 40/ 40/ 20 µg	20/ 20 µg
<b>Produção</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Baculovírus
<b>Adjuvantes</b>	225 µg de sulfato de alumínio de hidrofostato	Sistema ASO <sub>4</sub> : 500 µg de hidróxido de alumínio e 50 µg MPL
<b>Conservantes</b>	Ausente	Ausente
<b>Esquema de Vacinação</b>	0, 2 e 6 meses	0, 1 e 6 meses

Ambas são administradas intramuscularmente em três doses e a idade recomendada é dos 9 até aos 26 anos de idade para a Gardasil® e dos 10 aos 25 anos de idade para a Cervarix® (European Medicines Agency, 2010, 2013).

É de salientar que nenhuma das vacinas existentes confere protecção contra todos os tipos de HPV, pelo que a continuidade dos rastreios é fundamental.

### VIII.1. Estudos de Efectividade Profilática

A GSK, a Merck e o Instituto Nacional do Cancro nos Estados Unidos realizaram durante quatro anos ensaios clínicos randomizados em mulheres jovens, entre os 15 e os 26 anos de idade, de forma a confirmar a eficácia das vacinas comercializadas.

De acordo com os ensaios, ambas as vacinas, revelaram uma eficácia próxima de 100% aquando da prevenção da infecção por HPV 16 e 18, associada à displasia CIN 3, em mulheres jovens (designadas como amostra *TVC-naive*) que receberam pelo menos uma dose de vacina e que, até ao início do ensaio, não possuíam evidência de infecção genital por HPV (Lehtinen et al., 2012; Muñoz et al., 2010). A eficácia das vacinas

numa amostra de mulheres jovens (identificadas como amostra *TVC*), que receberam pelo menos uma dose de vacina e foram avaliadas independentemente de estarem infectadas por HPV foi substancialmente menor que a observada na *TVC-naïve* o que vai de encontro ao esperado, uma vez que muitas das mulheres poderiam ter infecções pré-existentes e as vacinas profiláticas não possuem qualquer efeito nesses casos (Lehtinen et al., 2012; Muñoz et al., 2010). Este resultado demonstra a importância de se administrar a vacina numa fase precoce e jovem, antes do início da actividade sexual de forma a diminuir o risco de contacto inicial com o HPV.

A Gardasil® revelou uma redução de 97% contra verrugas genitais relacionadas com o HPV 6 e 11 e uma redução superior a 95% de casos de HSIL e displasias da vulva (VIN 2/3) e vaginais (VaIN 2/3), relacionadas com o HPV 16 e 18 (Muñoz et al., 2010).

Paralelamente, um estudo realizado a jovens homossexuais do sexo masculino demonstrou um perfil de segurança favorável e uma acção preventiva da neoplasia anal intraepitelial (AIN) grau 1, 2 e 3 por parte da Gardasil®. Os autores, embora cientes que sejam necessários mais estudos, sugerem que esta protecção se estende igualmente ao sexo feminino e a homens heterossexuais que também estão susceptíveis à infecção anal intraepitelial, AIN e cancro anal (Palefsky et al., 2011).

Kreimer e seus colaboradores (2011) evidenciaram a protecção de infecções anais por HPV 16 e 18 oferecida Cervarix® em jovens do sexo feminino (Kreimer, González, et al., 2011).

A duração da protecção de ambas as vacinas revela ser de 5 anos para a Gardasil® e 8,4 anos para a Cervarix®. A durabilidade da Cervarix® pode ser explicada pelo seu sistema adjuvante AS04 que está concebido para garantir uma protecção longa através de uma resposta imune sustentável com elevados níveis de anticorpos neutralizantes (Brotherton e Gertig, 2011; Roteli-martins et al., 2012).

Em relação à segurança, ambas as vacinas exibem um excelente perfil. Os efeitos adversos mais comuns, passageiros e de resolução espontânea, envolvem dor pequena a moderada no local da injeção, cefaleias e fadiga (Einstein et al., 2009).

É de salientar que não há evidência que as vacinas actuem de forma terapêutica, removendo as infecções e lesões já existentes. De facto, é pouco provável que as vacinas sejam efectivas na eliminação de uma infecção pré-existente uma vez que a

camada basal do epitélio infectado por HPV não expressa níveis detectáveis de antígenos da cápside (L1 e L2) (Monie, Tsen, Hung, e Wu, 2009).

Um resumo dos vários ensaios clínicos efectuados às duas vacinas profiláticas do HPV encontra-se na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Resumo dos resultados provenientes dos ensaios clínicos realizados às vacinas Gardasil® e a Cervarix® (Schiller et al., 2012).

Grupo de estudo	Resultado	Gardasil®	Cervarix®
Mulheres Jovens	Protecção da infecção	Comprovada	Comprovada
	Protecção de CIN 2	Comprovada	Comprovada
	Protecção de CIN3	Comprovada	Comprovada
	Protecção de VIN/VaIN 2 e 3	Comprovada	Comprovada
	Protecção de verrugas genitais	Comprovada	-
	Protecção da infecção anal	Não comprovado	Comprovada
	Protecção cruzada	Comprovada	Comprovada
	Eficácia terapêutica	Nenhuma	Nenhuma
	Segurança	Sim	Sim
Mulheres Adultas	Protecção da infecção	Comprovada	Comprovada
	Protecção de CIN 2	Comprovada	Não comprovada
	Imunogenicidade	Comprovada	Comprovada
	Segurança	Sim	Sim
Homens Jovens	Protecção da infecção	Comprovada	Não comprovada
	Protecção de verrugas genitais	Comprovada	-
	Protecção da infecção anal	Comprovada	Não comprovada
	Protecção AIN 2	Comprovada	Não comprovada
	Segurança	Sim	Sim
Crianças	Protecção da infecção	Não comprovada	Não comprovada
	Imunogenicidade	Comprovada	Comprovada
	Segurança	Sim	Sim

CIN: Neoplasia cervical intraepitelial; VIN: Neoplasia da vulva intraepitelial; VaIN: Neoplasia vaginal intraepitelial.

Os ensaios clínicos de Fase III conduziram à autorização mundial de ambas as vacinas para indivíduos do sexo feminino e, mais recentemente, à aprovação da Gardasil® em indivíduos do sexo masculino em alguns países. Foi no final de 2011, princípio de 2012 que países como a Austrália, o Canadá, os Estados Unidos e a Áustria licenciaram e recomendaram a vacinação do HPV, no sexo masculino, com o intuito de prevenir verrugas ano-genitais e AIN (Crosignani et al., 2013).

Kreimer e seus colaboradores (2011) avaliaram a eficácia de uma dose inferior às três doses recomendadas pela Cervarix®. A sua análise indicou existir um efeito protector, essencialmente igual às três doses, de duas e até de uma dose. Porém, torna-se essencial realizar estudos adicionais de forma a determinar se doses inferiores a três irão proporcionar, a longo prazo, uma protecção comparável ao descrito (Kreimer, Rodriguez, et al., 2011). Estes dados, ainda que careçam de estudos, revelam-se importantes na medida em que a maior parte dos países afectados pelo CCU são países em vias de desenvolvimento, com recursos económicos insuficientes e em que o custo associado à administração das três doses é considerado elevado.

#### **VIII.1.1. Protecção Cruzada**

Protecção cruzada define-se como a capacidade de exhibir protecção contra outros tipos de HPV que não se encontram contidos na vacina (Kohli et al., 2012).

Apesar da ausência de evidência clínica e durabilidade da protecção, ambas as vacinas indicaram possuir um grau de protecção cruzada contra alguns tipos de HPV específicos, filogeneticamente relacionados com o HPV 16 (A9) e 18 (A7) - HPV 31 (A9) para a Gardasil® e HPV 31 (A9), 33 (A9) e 45 (A7) para a Cervarix® (Schiller et al., 2012). Para além disso, a Cervarix® exibiu também uma protecção, ainda que ligeira, para o HPV 51 (espécie A5) o que sugere que esta protecção cruzada se estende às espécies A7 e A9 (Wheeler et al., 2012).

Relacionando o perfil de protecção cruzada de ambas as vacinas, a Cervarix® assume uma ligeira vantagem na redução da incidência da CIN e do CCU. Possivelmente esta vantagem deve-se à presença do sistema adjuvante ASO<sub>4</sub>, que aumenta a resposta imune (Bresse, Adam, Langeron, Roze, e Marty, 2013; Wheeler et al., 2012).

Os mecanismos imunológicos associados à protecção cruzada ainda não estão completamente esclarecidos mas muito provavelmente relacionam-se com a partilha ou semelhanças estruturais entre epítomos (locais antigénicos localizados à superfície do virião na cápside L1), dos diferentes tipos de HPV, que acabam por induzir anticorpos neutralizantes ainda que em quantidades muito mais reduzidas que os contidos na vacina (Wheeler et al., 2012).

Apesar do benefício extra oferecido pela Gardasil® e Cervarix® é inexequível prever a protecção e a durabilidade destes tipos de HPV, não contidos na vacina, em mulheres vacinadas pelo que estudos de eficácia devem ser realizados.

Ainda que sejam poucos os tipos de HPV abrangidos por esta protecção cruzada, é importante considerar esta acção pois os tipos de HPV, não contidos na vacina, estão associados aproximadamente a 30% de casos de CCU (Schiller et al., 2012).

## **VIII.2. Estudos Custo-Efectividade**

A efectividade e impacto do programa de vacinação ao depender de taxas de cobertura e de medidas e estratégias nacionais, diverge de país para país. Ainda assim, um elevado número de estudos custo-effectividade indicam que a vacinação no sexo feminino possui benefícios económicos quando comparado à ausência de vacinação (Marty, Roze, Bresse, Langeron, e Smith-Palmer, 2013). Com a vacinação, há uma redução futura da necessidade de uma prevenção secundária e terciária e consequentemente uma redução de custos associados à infecção (Crosignani et al., 2013).

Contudo, um estudo epidemiológico recente revela que a vacinação não é mais segura ou efectiva que o rastreio citológico associado a procedimentos cirúrgicos (Wilyman, 2013). Wilyman (2013) considera que em países onde estão implementados e são requisitados programas de rastreio citológico, a introdução de um programa de vacinação não possui benefício custo-effectividade (Wilyman, 2013).

Goldie e seus colaboradores (2008) estudaram o perfil custo-effectividade em países com reduzidos recursos económicos, principalmente em África, e demonstraram que nesses países, onde o CCU não está controlado por programas de rastreio convencionais, o perfil é favorável (Goldie et al., 2008). Por outro lado, em países desenvolvidos, como a Irlanda, Reino Unido, Suíça, Finlândia e Holanda, que conseguem controlar a incidência do CCU através de programas de rastreio citológico sólidos e que por isso mantêm uma taxa de incidência reduzida, a vacina contra o HPV não é tão favorável no ponto de vista custo-effectividade. Estas evidências sugerem que o maior benefício da vacina não resulta da sua sinergia com programas de rastreio mas sim, na sua substituição em países ou regiões onde os programas de rastreio são insuficientes e existe uma alta prevalência de infecção por HPV AR (Fonseca, Ferreira, e Neto, 2013).

Permanece uma preocupação generalizada, pois a vacina contra o HPV é uma das vacinas mais caras do mercado, o que dificulta a sua implementação nos sistemas de saúde que mais beneficiariam da sua introdução, especialmente os países em vias de desenvolvimento (Fonseca et al., 2013).

Comparando ambas as vacinas, um estudo epidemiológico custo-efectividade realizado em França demonstrou que a Gardasil® possui maiores benefícios económicos em comparação à Cervarix®. Estes benefícios estão associados ao facto de existir uma maior prevenção de verrugas genitais (que origina uma poupança no sistema de saúde entre 37-56% ao longo de 100 anos), ao potencial de protecção cruzada (que corresponde a cerca de 4% dos custos de saúde) e à prevenção de carcinomas anais, da vulva e vaginais (Bresse et al., 2013). Este resultado foi de encontro a outros estudos realizados no Reino Unido, Irlanda e Canadá (Bresse et al., 2013).

Outro estudo realizado na Holanda onde a protecção cruzada e outros tipos de carcinomas (orofaríngeo ou anal) foram considerados (somente com a vacina bivalente) sugere que existem benefícios económicos e de saúde associados e que estes vão muito mais além da protecção contra o CCU (Luttjeboer et al., 2013).

### **VIII.3. Globalização da Vacina HPV**

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2011, 40 países, dos quais 22 Europeus, já tinham introduzido a vacina no seu plano nacional de vacinação (PNV) (World Health Organization, 2012). Os Estados Unidos, Reino Unido, Canadá e Austrália foram dos primeiros países. (Markowitz et al., 2012).

Características epidemiológicas, sociais e demográficas, assim como o respectivo sistema de saúde e infraestruturas resultaram na adopção de diversas estratégias de vacinação consoante o país em causa (Markowitz et al., 2012).

A idade de vacinação escolhida pela maior parte dos países foi entre os 10 e os 12 anos uma vez que a resposta imunológica à vacina demonstrou ser significativamente mais elevada entre os 9 e os 16 anos de idade e que se considerou a sua eficácia tanto maior quanto menor a probabilidade de se estar infectado (idealmente antes do início da actividade sexual) (Adams, Jasani, e Fiander, 2007).

#### **VIII.3.1. Casos de Sucesso**

A Austrália apesar de ter um programa nacional de *screening* de sucesso foi, em 2007, o primeiro país a desenvolver um PNV contra o HPV com a Gardasil®. Dados epidemiológicos (2007-2011) indicam que a incidência de verrugas genitais diminuiu 81.8% em mulheres vacinadas com idade inferior a 21 anos; o diagnóstico de verrugas genitais desceu para 93% ao fim do 5º ano da implementação do programa de



vacinação. Observou-se também uma diminuição da incidência de verrugas genitais em homens heterossexuais que não foram alvo de vacinação. Isto sugere uma protecção dos não vacinados como resultado de uma redução da prevalência microbial e consequente transmissão entre indivíduos (Ali et al., 2013).

Na Alemanha, Horn e seus colaboradores (2013) realizaram um estudo do efeito a longo prazo da vacinação (Horn et al., 2013). As suas estimativas, num modelo de 100 anos após a implementação do programa de vacinação foram: (i) na ausência de protecção cruzada o número de casos de CCU seria reduzido em 36.8% por ambas as vacinas; (ii) considerando o efeito de protecção cruzada, a redução seria de 43.8% para a vacina bivalente e 41.5% para a tetravalente (Horn et al., 2013).

Marty e seus colaboradores (2013) demonstraram, a nível Europeu, que a vacinação mútua de ambos os géneros contra o HPV 6, 11, 16 e 18 teria potencial para conduzir a uma diminuição significativa da incidência da infecção por HPV associada ao cancro (31% - 77% no sexo masculino e 14% - 68% no sexo feminino) e verrugas genitais (30% - 99% no sexo masculino e 21% - 98% no sexo feminino) (Marty et al., 2013).

### **VIII.3.2. Vacinação em Portugal**

A Gardasil® encontra-se autorizada em Portugal desde 2006 e a Cervarix® desde 2007. Porém, só em 2008, com base na proposta da Direcção Geral de Saúde e da Comissão Técnica de Vacinação, com a publicação em Diário da República, 2ª série, nº 57 de 20 de Março de 2008 – Despacho Ministerial n.º 8378/2008<sup>a</sup>, é que se aprovou a inclusão de uma vacina, dirigida ao HPV, no PNV (Ministério da Saúde, 2008). O despacho aprovou:

- i) A vacinação anual de rotina apenas do sexo feminino com 13 anos de idade, com início em 2008 (coorte nascida em 1995);
- ii) Uma campanha de repescagem, entre 2009 e 2011, a raparigas que completem os 17 anos de idade durante os dois anos de campanha (coortes nascidas em 1992, 1993 e 1994).

A campanha de repescagem e selecção das coortes foi baseada no grupo de idades que apresenta uma resposta imunológica mais efectiva e maior risco de infecção por HPV (Adams, Jasani, e Fiander, 2007). Actualmente, e com o término da repescagem em 2012, apenas uma coorte por ano (13 anos de idade) é vacinada (Ministério da Saúde,

2008). A Gardasil foi a vacina escolhida para integrar o PNV sendo por isso gratuita para a idade indicada.

A Cervarix® é a única comparticipada pelo Estado, em 37% que reflecte uma despesa de 46.26€ por dose (preço de venda ao público (PVP) 73.44€) num total de 138.80€ (3 doses) por mulher vacinada. A Gardasil® não tem qualquer comparticipação e o seu PVP é de 119.04€/dose. A vacina pode ser adquirida mediante receita médica em farmácias (INFARMED, n.d.).

Até hoje não estão disponíveis dados actuais e credíveis acerca dos custos associados à vacinação por parte do Sistema Nacional de Saúde (SNS) pelo que não é possível correlacionar ou retirar ilações sobre o seu custo-benefício. Porém, em Fevereiro de 2009 o INFARMED publicou uma nota de imprensa onde referiu que desde Dezembro de 2006, data do início da comercialização da vacina, foram disponibilizadas 268,753 doses de Gardasil®, das quais 181,535 foram através do PNV. Se tivermos em conta este valor e o custo que a Gardasil® apresenta, então as 181,535 doses disponibilizadas em aproximadamente 2 anos e dois meses corresponderam aproximadamente a 21.6 milhões de euros por parte do SNS (INFARMED, 2009).

## IX. NOVAS TERAPÊUTICAS: VACINAS DE 2ª GERAÇÃO

Actualmente estão a ser desenvolvidas vacinas profiláticas de 2ª geração com o objectivo de combater algumas das limitações das existentes como a protecção limitada aos tipos de HPV contidos na vacina (Peres, 2011). Paralelamente, estão a ser desenvolvidas vacinas de 2ª geração terapêuticas. A **Tabela 5** resume algumas das vacinas em desenvolvimento.

**Tabela 5.** Vacinas Profiláticas e Terapêuticas contra o HPV em desenvolvimento (Peres, 2011)

Indústria	Imunogénio	Tipo de Vacina	Fase do Ensaio Clínico (2011)
Merck	9 tipos de L1, em leveduras	Profilática	Fase III
Farmacêutica ISA	Péptidos longos da E6 e E7 sintetizados	Terapêutica	Fase II
Hoffman-La Roche	E6, E7 e interleucina 2 numa vacina recombinante	Terapêutica	Fase II
Advaxis	E7 atenuada, numa vacina viva <i>Listeria</i>	Terapêutica	Fase II
BioSidus	E7 fundido à L1	Profilática e Terapêutica	Pré- Clínica
Sanofi	L2	Profilática	Pré-Clínica
Indian Immunológica	L1 numa vacina tifoide recombinante	Profilática	Pré-Clínica
Cadila	L1 numa vacina sarampo recombinante	Profilática	Pré-Clínica

As vacinas profiláticas pretendem bloquear a entrada inicial do vírus nas células epiteliais enquanto, as vacinas terapêuticas pretendem gerar respostas imunes capazes de eliminar a infecção existente e lesões associadas.

Um estudo realizado por Smolen e seus colaboradores (2012) indica que a idade e a dose têm impacto diferente, respectivamente na formação das células de memória B e T e consequentemente sugere que o desenho e a concepção de novas vacinas deve ter em conta a intervenção que se pretende (Smolen et al., 2012).

## **IX.1. Vacinas Profiláticas**

As vacinas que existem actualmente são de custo elevado, requerem três doses e exigem condições específicas de armazenamento. Limitações estas que se evidenciam nos países em vias de desenvolvimento que carecem de recursos económicos e logísticos e que apresentam elevada incidência da infecção por HPV. Para além de tentarem maximizar a protecção contra os vários tipos de HPV, as novas vacinas pretendem também combater estas limitações (Lin, Doolan, et al., 2010; Monie et al., 2009).

Para Kawana e seus colaboradores (2012), a vacina profilática baseada em VLPs L1 para ser realmente efectiva teria que conter os 12 tipos de HPV AR no entanto, implicaria um custo muito elevado (Kawana, Adachi, Kojima, Kozuma, e Fujii, 2012).

### **IX.1.1. Vacinas profiláticas contra 9 tipos de HPV**

A Merck está a desenvolver uma vacina (V503) que pretende incorporar nove tipos de antígenos: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 e que neste momento se encontra em Fase III de ensaios clínicos. Segundo Serrano *et al.* (2012), se esta vacina possuir o mesmo nível de eficácia que as anteriores e se os programas de implementação da mesma forem eficientes, a taxa de incidência, a nível mundial, de CCU poderá ser reduzida substancialmente; a protecção de infecções associadas ao CCU poderia aumentar para 90% (Serrano et al., 2012).

### **IX.1.2. Vacinas profiláticas dirigidas às proteínas da cápside L2 do HPV**

Nos últimos anos têm-se assistido a um interesse gradual nas vacinas baseadas na proteína L2 da cápside (Schiller et al., 2012). Nas infecções naturais por HPV, as proteínas L2 da cápside não têm a capacidade de libertar anticorpos neutralizantes (Stanley et al., 2012). Todavia, a imunização com proteínas L2 da cápside produz anticorpos neutralizantes do tipo cruzado contra diversos tipos de HPV que afectam tanto as mucosas como o tecido cutâneo. Isto traduz-se na possibilidade de existir uma vacina monovalente de baixo custo e com grande potencial protector (Schiller et al., 2012; Stanley et al., 2012). Porém, e comparando com as partículas VLP L1, as L2 são fracamente imunogénicas pelo que se tem tentado criar e desenvolver estratégias no sentido de fortalecer a sua imunogenicidade, nomeadamente através do uso de adjuvantes como os agonistas TLR2 (Lin, Doolan, et al., 2010). Segundo Stanley e seus

colaboradores (2012) é fundamental recorrer a ensaios clínicos que demonstrem a segurança, eficácia e imuno-patogenicidade destas vacinas (Stanley et al., 2012).

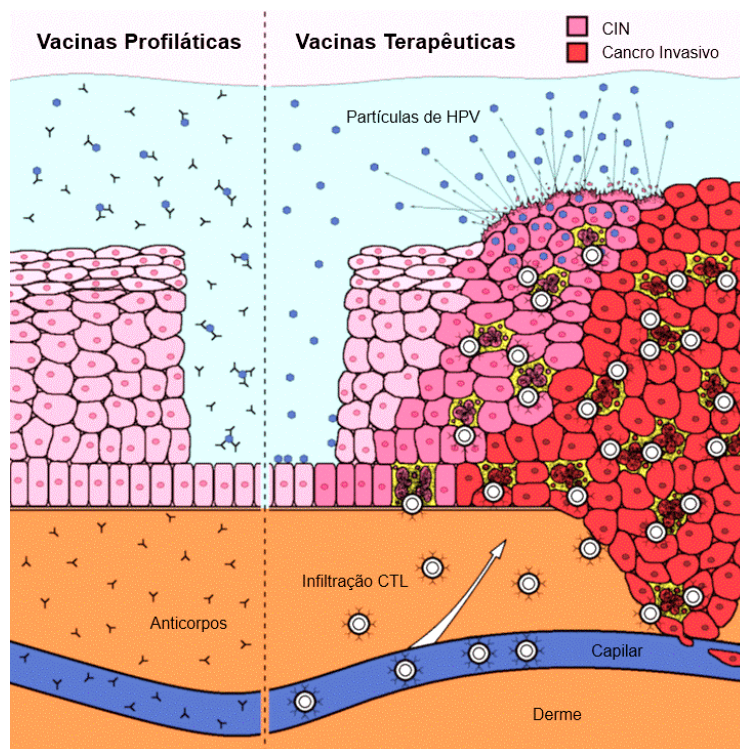
## **IX.2. Vacinas Terapêuticas**

Estas vacinas, de carácter terapêutico, têm como objectivo controlar ou regredir infecções ou lesões específicas do HPV.

Os alvos terapêuticos destas vacinas devem-se focar em antigénios HPV constitutivos expressos tanto na infecção persistente por HPV bem como no carcinoma invasivo. As vacinas profiláticas utilizam VLPs L1 e/ou L2 no entanto, as proteínas da cápside são praticamente indetectáveis na camada basal, em lesões pré-cancerígenas e no carcinoma invasivo pelo que não podem ser utilizadas como alvos nas vacinas terapêuticas (Lin, Roosinovich, et al., 2010; Monie et al., 2009). Desta forma, os alvos da vacina terapêutica têm-se centrado em proteínas essenciais ao processo de transformação celular nomeadamente na E6 e E7, que não têm expressão em células normais mas que se encontram sempre presentes em células infectadas com o HPV (Kawana et al., 2012).

Diversos métodos têm sido utilizados no desenvolvimento das vacinas terapêuticas e incluem vacinas peptídicas, ou à base de proteínas, vacinas baseadas em vectores vivos, vacinas baseadas no DNA ou RNA, vacinas de células inteiras e combinações. As vacinas baseadas no DNA são as de eleição pela sua segurança, estabilidade e habilidade em induzir antigénios de imunidade específica (Lin, Roosinovich, et al., 2010).

Os mecanismos de actuação das vacinas profiláticas e terapêuticas distinguem-se. A vacina profilática foca-se na imunidade humoral (linfócitos B) enquanto, que a vacina terapêutica foca-se essencialmente na imunidade mediada por células (linfócitos T). Os linfócitos T citotóxicos (CTL) são capazes de reconhecer e matar as células infectadas (Han e Sin, 2013; Lin, Roosinovich, et al., 2010). Os dois mecanismos de actuação das vacinas contra o HPV, profilática e terapêutica, encontram-se na **Figura 11**.



**Figura 11. Vacina Profilática versus Vacina Terapêutica.** As vacinas profiláticas induzem anticorpos neutralizantes contra a proteína L1 da cápside do virião. As vacinas terapêuticas induzem linfócitos T citotóxicos (CTL). Os CTLs reconhecem proteínas reguladoras do HPV e matam as células nocivas (Han e Sin, 2013).

Até ao momento não existem dados concretos resultantes dos ensaios clínicos sobre a eficácia destas vacinas. Este tipo de terapêutica combinada com outros tratamentos como a quimioterapia e a radiação podem ter potencial para controlar as infecções por HPV associadas à carcinogénese (Monie et al., 2009).

## X. CONCLUSÕES

A infecção por HPV é considerada o factor etiológico mais relevante no CCU e lesões precursoras (CIN), causando anualmente meio milhão de casos de CCU dos quais cerca de metade acabam por ser fatais. O CCU é assim o terceiro cancro mais comum entre as mulheres. Em Portugal 13.5 mulheres em 100.000 são afectadas pelo CCU, o que demonstra uma alta taxa de incidência.

Com base nestes dados torna-se essencial discutir e apostar na concepção e desenvolvimento de novas estratégias preventivas e terapêuticas. De forma a contribuir para este desenvolvimento é fundamental compreender os mecanismos associados à infecção e à sua progressão maligna.

A introdução das vacinas profiláticas marcou o início de uma nova fase de combate contra a infecção por HPV e lesões associadas, nomeadamente contra o CCU. Até à data, estudos efectuados têm relevado resultados positivos e benéficos associados à vacinação porém, o seu impacto a nível global continua ainda por determinar, carecendo de mais estudos.

Cada país tem um programa de rastreio e um PNV diferente, adaptado às suas infra-estruturas, condições económicas, populacionais e logísticas. Para que exista uma percepção nacional e global do impacto da vacinação incluindo a durabilidade da sua protecção e custo-benefício, é essencial que, cada país monitorize a incidência da infecção por HPV e CCU assim como os custos associados à prevenção primária, secundária e terciária. Desta forma também é possível otimizar estratégias de prevenção, nomeadamente ao nível dos rastreios organizados, e maximizar o benefício decorrente da vacinação. Neste cenário, Portugal, apesar de já ter desenvolvido alguns estudos, ainda não revelou dados suficientes acerca do impacto da vacina desde da sua implementação.

As vacinas profiláticas demonstram ser uma forte promessa na redução da incidência do CCU, no entanto outras estratégias estão a ser desenvolvidas de forma a ultrapassar as limitações associadas à Cervarix® e à Gardasil®, nomeadamente a ausência de protecção contra outros tipos de HPV e período de protecção. No futuro é essencial pensar numa vacina eficiente, seja esta profilática ou terapêutica, mas também acessível e viável à população, em termos económicos e logísticos, pois são os países em vias de desenvolvimento que, pela escassez de recursos, mais carecem de meios de rastreio e de diagnóstico sendo por isso os mais afectados com a infecção por HPV e CCU.





## XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M., Jasani, B., e Fiander, a. (2007). Human papilloma virus (HPV) prophylactic vaccination: challenges for public health and implications for screening. *Vaccine*, 25(16), 3007–13. doi:10.1016/j.vaccine.2007.01.016
- Ali, H., Donovan, B., Wand, H., Read, T. R. H., Regan, D. G., Grulich, A. E., ... Guy, R. J. (2013). Genital warts in young Australians five years into national human papillomavirus vaccination programme: national surveillance data. *BMJ*, 346(2032), 1–9. doi:10.1136/bmj.f2032
- Arbyn, M., Bosch, F. X., Cuzick, J., Denny, L., Galloway, D., Giuliano, A. R., ... zur Hausen, H. (2007). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - VOLUME 90 - Human Papillomaviruses*. (World Health Organization, Ed.). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90.pdf>
- Banks, L., Blum, H. E., Carbone, A., Cesarman, E., Chen, C.-J., de Sanjosé, S., ... Stuver, S. O. (2012). *A review of human carcinogens: biological agents*. (World Health Organization, Ed.) *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* (Vol. 100B). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/mono100B.pdf>
- Banks, L., Pim, D., e Thomas, M. (2012). Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 12(12), 877–86. doi:10.1038/nrc3400
- Bernard, H.-U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 32, S1–6. doi:10.1016/j.jcv.2004.10.021
- Bernard, H.-U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. Zur, e de Villiers, E.-M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70–9. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002

- Bernard, H.-U., Calleja-Macias, I. E., e Dunn, S. T. (2006). Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*, 118(5), 1071–1076. doi:10.1002/ijc.21655
- Bodily, J., e Laimins, L. a. (2011). Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in microbiology*, 19(1), 33–9. doi:10.1016/j.tim.2010.10.002
- Branco, E. C., Fernandes, F., Peralta, F., Mota, F., Martins, F. N., Borges, G., ... Pereira, D. (2004). *Consenso em Patologia Cervico-Vulvovaginal*. Póvoa de Varzim. Disponível em <http://www.spginecologia.pt/uploads/patologia.pdf>
- Bresse, X., Adam, M., Largeron, N., Roze, S., e Marty, R. (2013). A comparative analysis of the epidemiological impact and disease cost-savings of HPV vaccines in France. *Human vaccines e immunotherapeutics*, 9(4), 823–833. Disponível em <http://dx.doi.org/10.4161/hv.22994>
- Brotherton, J. M., e Gertig, D. M. (2011). Primary prophylactic human papillomavirus vaccination programs : future perspective on global impact. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(8), 627–639. doi:10.1586/ERI.11.78
- Bruni, L., Diaz, M., Castellsague, X., Ferrer, E., Bosch, F. X., e Sanjose, S. De. (2010). Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents : Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *Journal Infected Disease*, 202(12), 1789–1799. doi:10.1086/657321
- Carcopino, X., Henry, M., Olive, D., Boubli, L., e Tamalet, C. (2011). Detection and quantification of human papillomavirus genital infections: virological, epidemiological, and clinical applications. *Médecine et maladies infectieuses*, 41(2), 68–79. doi:10.1016/j.medmal.2010.07.013
- Chan, P. K. S., Picconi, M. A., Cheung, T. H., Giovannelli, L., e Park, J. S. (2012). Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 49(4), 117–36. doi:10.3109/10408363.2012.707174

- Chelimo, C., Wouldes, T. a, Cameron, L. D., e Elwood, J. M. (2013). Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *The Journal of infection*, 66(3), 207–17. doi:10.1016/j.jinf.2012.10.024
- Crosignani, P., De Stefani, A., Fara, G. M., Isidori, A. M., Lenzi, A., Liverani, C. A., ... Zuccotti, G. V. (2013). Towards the eradication of HPV infection through universal specific vaccination. *BMC public health*, 13(642), 1–11. doi:10.1186/1471-2458-13-642
- De Oliveira Santos, N. S., Romanos, M. T. V., e Wigg, M. D. (2008). *Introdução à Virologia Humana* (2nd ed., pp. 455–462). Guanabara Koogan S.A.
- De Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., ... Shin, H.-R. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The lancet oncology*, 11(11), 1048–56. doi:10.1016/S1470-2045(10)70230-8
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., e Stanley, M. a. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55–70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- Einstein, M. H., Baron, M., Levin, M. J., Chatterjee, A., Edwards, R. P., Zepp, F., ... Group, H.-S. (2009). Comparison of the immunogenicity and safety of cervical cancer vaccines in healthy women aged 18 – 45 years. *Human Vaccines*, 5(10), 705–719. Disponível em [www.landesbioscience.com/journals/vaccines/9518](http://www.landesbioscience.com/journals/vaccines/9518)
- European Medicines Agency. (2010). *Gardasil*. Londres, Reino Unido. Disponível em [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000703/WC500021146.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000703/WC500021146.pdf)
- European Medicines Agency. (2013). *Cervarix*. Londres, Reino Unido. Disponível em [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000721/WC500024634.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000721/WC500024634.pdf)

- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., e Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 127(12), 2893–917. doi:10.1002/ijc.25516
- Ferraz, L. D. C., Beatriz, A., Santos, R., e Discacciati, M. G. (2012). Ciclo celular , HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. *Health Sciences Institute*, 30(2), 107–111. Disponível em [http://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2012/02\\_abr-jun/V30\\_n2\\_2012\\_p107-111.pdf](http://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2012/02_abr-jun/V30_n2_2012_p107-111.pdf)
- Fonseca, A. J. Da, Ferreira, L. C. D. L., e Neto, G. B. (2013). Cost-effectiveness of the vaccine against human papillomavirus in the Brazilian Amazon region. *Revista da Associação Médica Brasileira*. doi:10.1016/j.ramb.2013.03.004
- Forman, D., de Martel, C., Lacey, C. J., Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Bruni, L., ... Franceschi, S. (2012). Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, 30(5), F12–23. doi:10.1016/j.vaccine.2012.07.055
- Frazer, I. H. (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature reviews. Immunology*, 4(1), 46–54. doi:10.1038/nri1260
- Ganguly, N., e Parihar, S. P. (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *Journal of biosciences*, 34(1), 113–123. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430123>
- Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B., e Tommasino, M. (2010). The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus genes*, 40(1), 1–13. doi:10.1007/s11262-009-0412-8
- Goldie, S. J., O'Shea, M., Campos, N. G., Diaz, M., Sweet, S., e Kim, S.-Y. (2008). Health and economic outcomes of HPV 16,18 vaccination in 72 GAVI-eligible countries. *Vaccine*, 26(32), 4080–93. doi:10.1016/j.vaccine.2008.04.053
- Goldman, L., e Schafer, A. I. (2012). *Goldman's Cecil Medicine*. (L. Goldman, Ed.) (24th ed., pp. 2121–2125). New York, EUA: Elsevier.

- Gravitt, P. E. (2011). The known unknowns of HPV natural history. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(12), 4593–4599. doi:10.1172/JCI57149.live
- Hahn, H. S., Kee, M. K., Kim, H. J., Kim, M. Y., Kang, Y. S., Park, J. S., e Kim, T. J. (2013). Distribution of maternal and infant human papillomavirus: risk factors associated with vertical transmission. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.02.024
- Han, K. T., e Sin, J. (2013). DNA vaccines targeting human diseases : progresses in animal and clinical studies. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2, 106–104. doi:10.7774/cevr.2013.2.2.106
- Horn, J., Damm, O., Kretzschmar, M. E. E., Deleré, Y., Wichmann, O., Kaufmann, A. M., ... Mikolajczyk, R. T. (2013). Estimating the long-term effects of HPV vaccination in Germany. *Vaccine*, 31(19), 2372–2380. doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.006
- INFARMED. (n.d.). Infomed. Retrieved September 12, 2013, from <http://www.infarmed.pt/infomed/pesquisa.php>
- INFARMED. (2009). Nota de imprensa: Esclarecimento sobre a segurança do medicamento Gardasil. Acedido a 22 Setembro, 2013, disponível em <http://www.infarmed.pt/portal/pls/portal/docs/1/8671138.PDF>
- Jong, A. De, Poelgeest, M. I. E. Van, Hulst, J. M. Van Der, Poelgeest, I. E. Van, e Drijfhout, J. W. (2004). Human Papillomavirus Type 16-Positive Cervical Cancer Is Associated with Impaired CD4 + T-Cell Immunity against Early Antigens E2 and E6. *Cancer Research*, 64, 5449–5455. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0831
- Kawana, K., Adachi, K., Kojima, S., Kozuma, S., e Fujii, T. (2012). Therapeutic Human Papillomavirus (HPV) Vaccines: A Novel Approach. *The Open Virology Journal*, 6(2), 264–269. doi:10.2174/1874357901206010264

- Kohli, M., Lawrence, D., Haig, J., Anonychuk, A., e Demarteau, N. (2012). Modeling the impact of the difference in cross-protection data between a human papillomavirus ( HPV ) -16/18 AS04-adjuvanted vaccine and a in Canada. *BMC Public Health*, 12(872), 1–17. doi:10.1186/1471-2458-12-872
- Kreimer, A. R., González, P., Katki, H. A., Porras, C., Schiff, M., Rodriguez, A. C., ... Hildesheim, A. (2011). Efficacy of a bivalent HPV 16/18 vaccine against anal HPV 16/18 infection among young women : a nested analysis within the Costa Rica Vaccine Trial. *Lancet Oncol*, 12(9), 862–870. doi:10.1016/S1470-2045(11)70213-3
- Kreimer, A. R., Rodriguez, A. C., Hildesheim, A., Herrero, R., Porras, C., Schiffman, M., ... Wacholder, S. (2011). Proof-of-principle evaluation of the efficacy of fewer than three doses of a bivalent HPV16/18 vaccine. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(19), 1444–1451. doi:10.1093/jnci/djr319
- Lehtinen, M., Paavonen, J., Wheeler, C. M., Jaisamrarn, U., Garland, S. M., Castellsagué, X., ... Mindel, A. (2012). Overall efficacy of HPV-16 / 18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia : 4-year end-of-study analysis of the randomised , double-blind PATRICIA trial. *The lancet oncology*, 13(1), 89–99. doi:10.1016/S1470-2045(11)70286-8
- Lin, K., Doolan, K., Hung, C.-F., e Wu, T.-C. (2010). Perspectives for Preventive and Therapeutic HPV Vaccines. *Formosan Medical Association*, 109(1), 4–24.
- Lin, K., Roosinovich, E., Ma, B., Hung, C.-F., e Wu, T.-C. (2010). Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunologic Researcher*, 47(1-3), 86–112. doi:10.1007/s12026-009-8141-6.Therapeutic
- Liverani, C. A. (2013). The four steps in the prevention of human papillomavirus-associated neoplasia. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 1–10. doi:10.1007/s00404-013-3011-9

- Louie, K. S., Sanjose, S. De, e Mayaud, P. (2009). Review Epidemiology and prevention of human papillomavirus and cervical cancer in sub-Saharan Africa : a comprehensive review. *Tropical Medicine and International Health*, 14(10), 1287–1302. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02372.x
- Luttjeboer, J., Westra, T. A., Wilschut, J. C., Nijman, H. W., Daemen, T., e Postma, M. J. (2013). Cost – effectiveness of the prophylactic HPV vaccine : An application to the Netherlands taking non-cervical cancers and cross-protection into account. *Vaccine*, 31(37), 3922–3927. doi:10.1016/j.vaccine.2013.06.044
- Maglennon, G. A., e Doorbar, J. (2012). The Biology of Papillomavirus Latency. *The Open Virology*, 6(2), 190–197.
- Mariani, L., e Venuti, A. (2010). HPV vaccine: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future. *Journal of translational medicine*, 8(1), 105. doi:10.1186/1479-5876-8-105
- Markowitz, L. E., Tsu, V., Deeks, S. L., Cubie, H., Wang, S. a, Vicari, A. S., e Brotherton, J. M. L. (2012). Human papillomavirus vaccine introduction-the first five years. *Vaccine*, 30, F139–48. doi:10.1016/j.vaccine.2012.05.039
- Marty, R., Roze, S., Bresse, X., Langeron, N., e Smith-Palmer, J. (2013). Estimating the clinical benefits of vaccinating boys and girls against HPV-related diseases in Europe. *BMC cancer*, 13(1), 10. doi:10.1186/1471-2407-13-10
- Medeiros, R., e Ramada, D. (2010). Knowledge differences between male and female university students about human papillomavirus (HPV) and cervical cancer: Implications for health strategies and vaccination. *Vaccine*, 29(2), 153–60. doi:10.1016/j.vaccine.2010.10.068
- Ministério da Saúde. Despacho n.º 8378/2008, 2ª Serie nº 57 (2008). Portugal: Diário da República. Disponível em [http://www.portaldasauade.pt/NR/rdonlyres/88239184-3C05-4EE2-8D8D-437CFC40DCE8/0/Desp8378\\_NovoesquemadoPNV.pdf](http://www.portaldasauade.pt/NR/rdonlyres/88239184-3C05-4EE2-8D8D-437CFC40DCE8/0/Desp8378_NovoesquemadoPNV.pdf)
- Monie, A., Tsen, S.-W. D., Hung, C.-F., e Wu, T.-C. (2009). Therapeutic HPV DNA vaccines. *Expert review of vaccines*, 8(9), 1221–1235. doi:10.1586/erv.09.76

- Moody, C. a, e Laimins, L. a. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews. Cancer*, 10(8), 550–560. doi:10.1038/nrc2886
- Moscicki, A.-B., Schiffman, M., Burchell, A., Albero, G., Giuliano, A. R., Goodman, M. T., ... Palefsky, J. (2012). Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine*, 30, F24–33. doi:10.1016/j.vaccine.2012.05.089
- Mu, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., ... Hun, K. (2004). Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *Journal of Virology*, 78(21), 11451–11460. doi:10.1128/JVI.78.21.11451
- Muñoz, N., Kjaer, S. K., Sigurdsson, K., Iversen, O.-E., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., ... Haupt, R. M. (2010). Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(5), 325–39. doi:10.1093/jnci/djp534
- Oliveira, A., Delgado, C., Verdasca, N., e Pista, A. (2013). Indicadores de Prognóstico da Carcinogénese do Colo do Útero Associada à Infecção por Vírus do Papiloma Humano. *Acta Médica Portuguesa*, 26(2), 139–144.
- Palefsky, J. M., Giuliano, A. R., Goldstone, S., Moreira, E. D., Aranda, C., Jessen, H., ... Garner, E. I. O. (2011). HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. *The New England journal of medicine*, 365(17), 1576–85. doi:10.1056/NEJMoa1010971
- Pereira, R., Hitzeroth, I. I., e Rybicki, E. P. (2009). Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses. *Archives of virology*, 154(2), 187–197. doi:10.1007/s00705-009-0310-3
- Peres, J. (2011). For cancers caused by HPV, two vaccines were just the beginning. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(5), 360–2. doi:10.1093/jnci/djr053



- Pista, A., Oliveira, A., Verdasca, N., e Ribeiro, F. (2011). Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clinical microbiology and infection*, 17(6), 941–946. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03387.x
- Pista, A., Oliveira, C. F., Cunha, M. J., Paixão, M. T., e Real, O. (2011). Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Women in Portugal - The CLEOPATRE Portugal Study. *International Journal of Gynecological Cancer*, 21(6), 1150–1158.
- Pista, A., Oliveira, C., Lopes, C., e Cunha, M. (2013). Human Papillomavirus Type Distribution in Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3 and Cervical Cancer in Portugal. *International Journal of Gynecological Cancer*, 23, 500–506.
- Poljak, M., Cuzick, J., Kocjan, B. J., Iftner, T., Dillner, J., e Arbyn, M. (2012). Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F100–106. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.105
- Roden, R., e Wu, T.-C. (2006). How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nature reviews. Cancer*, 6(10), 753–63. doi:10.1038/nrc1973
- Rombaldi, R. L., Serafini, E. P., Mandelli, J., Zimmermann, E., e Losquiavo, K. P. (2008). Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Virology journal*, 5, 106. doi:10.1186/1743-422X-5-106
- Roteli-martins, C. M., Naud, P., Borba, P. De, Teixeira, J. C., Carvalho, N. S. De, Zahaf, T., ... Descamps, D. (2012). Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV -16/18 AS04-adjuvanted vaccine up to 8.4 years of follow up. *Human vaccines e Immunotherapeutics*, 8(3), 390–397. doi:10.4161/hv.18865
- Saslow, D., Solomon, D., Lawson, H. W., Killackey, M., Kulasingam, S. L., Cain, J., ... Wilbur, D. C. (2012). American Cancer Society , American Society for Colposcopy and Cervical Pathology , and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *Am J. Clin. Pathol*, 3, 516–542. doi:10.1309/AJCPTGD94EVR SJCG

- Schiller, J. T., Castellsagué, X., e Garland, S. M. (2012). A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine*, 30, F123–38. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.108
- Schiller, J. T., Day, P. M., e Kines, R. C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic oncology*, 118(1), S12–17. doi:10.1016/j.ygyno.2010.04.004
- Schiller, J. T., e Lowy, D. R. (2012). Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nature reviews. Microbiology*, 10, 681–692. doi:10.1038/nrmicro2872
- Serrano, B., Alemany, L., Tous, S., Bruni, L., Clifford, G. M., Weiss, T., ... de Sanjosé, S. (2012). Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infectious agents and cancer*, 7(1), 38. doi:10.1186/1750-9378-7-38
- Smolen, K. K., Gelinas, L., Franzen, L., Dobson, S., Dawar, M., Ogilvie, G., ... Kollmann, T. R. (2012). Age of recipient and number of doses differentially impact human B and T cell immune memory responses to HPV vaccination. *Vaccine*, 30(24), 3572–3579. doi:10.1016/j.vaccine.2012.03.051
- Stanley, M. (2010a). Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology*, 117(2), S5–10. doi:10.1016/j.ygyno.2010.01.024
- Stanley, M. (2010b). HPV - immune response to infection and vaccination. *Infectious agents and cancer*, 5(19), 1–6. doi:10.1186/1750-9378-5-19
- Stanley, M., Pinto, L. a, e Trimble, C. (2012). Human papillomavirus vaccines-immune responses. *Vaccine*, 30(5), F83–87. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.106
- Stern, P. L., van der Burg, S. H., Hampson, I. N., Broker, T. R., Fiander, A., Lacey, C. J., ... Einstein, M. H. (2012). Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease. *Vaccine*, 30, F71–82. doi:10.1016/j.vaccine.2012.05.091

- Sun, A., Bagella, L., Tutton, S., Romano, G., e Giordano, A. (2007). From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 102(6), 1400–1404. doi:10.1002/jcb.21609
- Thomison, J., Thomas, L. K., e Shroyer, K. R. (2008). Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human pathology*, 39(2), 154–166. doi:10.1016/j.humpath.2007.11.002
- Tota, J. E., Chevarie-Davis, M., Richardson, L. a, Devries, M., e Franco, E. L. (2011). Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Preventive medicine*, 53(1), S12–21. doi:10.1016/j.ypmed.2011.08.017
- Veldhuijzen, N. J., Snijders, P. J., Reiss, P., Meijer, C. J., e van de Wijgert, J. H. (2010). Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *The Lancet infectious diseases*, 10(12), 862–874. doi:10.1016/S1473-3099(10)70190-0
- Vincenzo, R. De, Ricci, C., Conte, C., e Scambia, G. (2013). HPV vaccine cross-protection : Highlights on additional clinical benefit. *Gynecologic Oncology*, 130, 642–651. doi:10.1016/j.ygyno.2013.05.033
- Wang, J. W., e Roden, R. B. S. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445, 175–186. doi:10.1016/j.virol.2013.04.017
- Wheeler, C. M., Castellsagué, X., Garland, S. M., Szarewski, A., Paavonen, J., Naud, P., ... Lehtinen, M. (2012). Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04 adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types : 4-year end-of-study analysis of the randomised , double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol*, 13(1), 100–110. doi:10.1016/S1470-2045(11)70287-X
- Wilyman, J. (2013). HPV vaccination programs have not been shown to be cost-effective in countries with comprehensive Pap screening and surgery. *Infectious agents and cancer*, 8(21), 1–8. doi:10.1186/1750-9378-8-21

Woodman, C. B. J., Collins, S. I., e Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer*, 7(1), 11–22. doi:10.1038/nrc2050

World Health Organization. (2009). Human Papillomavirus vaccines WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*, 84(15), 117–132.

World Health Organization. (2012). *Report of the HPV Vaccine Delivery Meeting: Identifying Needs for Implementation e Research* (pp. 17–19). Geneva. Disponível em [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/76532/1/WHO\\_IVB\\_12.09\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/76532/1/WHO_IVB_12.09_eng.pdf)